

**Identifikation und Charakterisierung neuer
Interaktionspartner und Zielgene
der
Proteinargininmethyltransferase 4**

Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Gundula Streubel
aus Magdeburg

Marburg/Lahn, Februar 2010

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 10.02.2010 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uta-Maria Bauer

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Uwe Maier

Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am 26.03.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung.....	3
2.1. Die Regulation chromatinvermittelter Prozesse	3
2.2. Die Familie der Chromatinremodeller.....	5
2.2.1. Die Familie der SWI/SNF-Remodeller.....	6
2.2.2. Die CHD-Familie.....	6
2.2.3. Mi-2 ist Bestandteil des NuRD-Komplexes.....	7
2.3. Die Enzymfamilie der Proteinargininmethyltransferasen (PRMTs)	9
2.3.1. Die Methylierung von Argininen	9
2.3.2. Struktur und Katalyse der Proteinargininmethyltransferasen (PRMTs)	9
2.3.3. Substrate der PRMTs	12
2.3.4. Funktionen der PRMTs – Studien von PRMT- <i>knock-out</i> Mäusen	13
2.3.5. Zelluläre Funktionen der PRMTs	14
2.3.6. Regulation der PRMTs	18
2.4. Funktionen von PRMT4	19
2.4.1. PRMT4 als Coaktivator der Transkription	19
2.4.2. PRMT4 wirkt mit Chromatinremodellern in der Transkription zusammen	20
2.4.3. PRMT4 in der Zellproliferation und Tumorgenese.....	21
2.4.4. Die Rolle von PRMT4 in Entwicklungsprozessen.....	21
2.5. Zielsetzung.....	23
3. Material	25
3.1. Bakterienstämme	25
3.2. Bakterienmedien und Zusätze.....	25
3.3. Zelllinien	25
3.4. Zellkulturmaterialien	26
3.5. Cytokine.....	26
3.6. Transfektionsreagenzien	26
3.7. Plasmide	27
3.7.1. Expressionsplasmide für Bakterien	27
3.7.2. Expressionsplasmide für eukaryotische Zellen	29

3.8. Antikörper.....	34
3.8.1. Erstantikörper für Western Blot.....	34
3.8.2. Zweitantikörper für Western Blot	35
3.8.3. Antikörper für Immunpräzipitation und Chromatinimmunpräzipitation	35
3.9. Oligonukleotide	36
3.9.1. Sequenzierprimer	36
3.9.2. Primer für quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	36
3.9.3. Primer für CHIP-Analysen	38
3.9.4. siRNA	38
3.10. Enzyme	40
3.11. Inhibitoren.....	40
3.12. Radioaktive Substanzen	41
3.13. Standards.....	41
3.14. Chromatographiematerialien.....	41
3.15. Kommerzielle Kits.....	41
3.16. Sonstige Chemikalien	42
3.17. Sonstige Verbrauchsmaterialien	42
3.18. Geräte.....	43
4. Methoden	44
4.1. Molekularbiologische Techniken.....	44
4.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	44
4.1.2. Transformation kompetenter Bakterien.....	44
4.1.3. Maxi- Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	45
4.1.4. Mini-Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> nach LiCl-Methode	46
4.1.5. Konzentrationsbestimmung des Nukleinsäuregehalts	47
4.1.6. Restriktion von DNA	47
4.1.7. Auffüllen des 5'-Überhang mit Klenow-Fragment	48
4.1.8. 5' Dephosphorylierung von Vektoren	48
4.1.9. Agarose-Gelelektrophorese	49
4.1.10. Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Agarosegel.....	49
4.1.11. Aufreinigung von Vektoren und DNA-Fragmenten.....	49
4.1.12. Ligation von DNA.....	50

4.1.13. DNA-Sequenzanalyse	50
4.1.14. Polymerasekettenreaktion (PCR)	50
4.1.15. Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR)	51
4.1.16. Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	53
4.1.17. Reverse Transkription	53
4.2. Zellbiologische Techniken	55
4.2.1. Kultivierung eukaryotischer adhärenter Zellen	55
4.2.2. Kultivierung eukaryotischer Suspensionszellen	55
4.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen	56
4.2.4. Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	56
4.2.5. Bestimmung der Zellvitalität durch Färbung mit Trypanblau	56
4.2.6. Differenzierung von K562 Zellen mit Hemin und Cytosinarabinosid (Ara-C).....	57
4.2.7. Benzidinfärbung (TMB)	57
4.2.8. Wachstumskurven.....	58
4.2.9. Wachstum in Methylcellulose	58
4.2.10. Transfektion adhärenter Zellen mit DNA durch Calcium-Phosphat	59
4.2.11. Transfektion adhärenter Zellen mit DNA durch Fugene HD	60
4.2.12. Transfektion adhärenter Zellen mit siRNA durch Oligofectamine.....	61
4.2.13. Transfektion nicht-adhärenter Zellen mit siRNA durch Elektroporation.....	62
4.2.14. Zellzyklusanalyse von K562-Zellen durch Propidiumiodid-FACS.....	62
4.3. Chromatographische Techniken.....	64
4.3.1. Reinigung von Proteinfractionen über Phosphocellulose.....	64
4.3.2. Reinigung von Proteinfractionen über den Anionenaustauscher EMD-DEAE- Fractogel 650 (EDF)	64
4.3.3. Reinigung von Proteinfractionen über den Anionenaustauscher MonoQ	65
4.3.4. Analytische Gelfiltration	65
4.4. Proteinbiochemische Techniken	67
4.4.1. Präparation von Gesamtprotein aus Säugerzellen (IPH-Extrakt).....	67
4.4.2. Präparation von Kernextrakt nach Dignam.....	67
4.4.3. Detergenzbasierte Präparation von Kernextrakt	68

4.4.4. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	69
4.4.5. Ankonzentrieren von Proteinen mit Strataclean-Beads	69
4.4.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen.....	70
4.4.7. Coomassiefärbung von Proteingelen	71
4.4.8. Silberfärbung von Proteingelen	71
4.4.9. Analyse von Proteinen mit Maldi-TOF	72
4.4.10. Western Blot, nass	72
4.4.11. Western Blot, halbtrocken (<i>Semi-Dry</i>)	73
4.4.12. Ponceau S-Färbung.....	74
4.4.13. Immunfärbung von Blot-Membranen.....	74
4.4.14. Ablösen von Antikörpern von der Western Blot-Membran	75
4.4.15. Präparation von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien	75
4.4.16. Präparation von His-Fusionsproteinen aus Bakterien	76
4.4.17. GST-Pulldown aus Zellextrakten	78
4.4.18. GST-Pulldown mit rekombinanten Proteinen.....	78
4.4.19. <i>In vitro</i> Translation (IVT).....	79
4.4.20. GST-IVT-Pulldown.....	79
4.4.21. <i>In vitro</i> -Methylierung	80
4.4.22. Immunpräzipitation.....	81
4.4.23. Coimmunpräzipitation	81
4.4.24. Chromatinimmunpräzipitation (ChIP).....	82
4.4.25. Affinitätsaufreinigung von Antikörpern	85
5. Ergebnisse.....	87
5.1. Analyse der transkriptionellen Kooperation von PRMT1 und PRMT4 in der STAT5-vermittelten Genexpression.....	87
5.1.1. Die PRMT1/PRMT4-regulierten Zielgene CITED2 und KRT8 werden durch IL-4 induziert.....	88
5.1.2. STAT5, PRMT1 und PRMT4 sind essentiell für die IL-4-abhängige Transkription von CITED2.....	89
5.1.3. CITED2 ist ein direktes Zielgen von STAT5, PRMT1 und PRMT4	91

5.1.4. PRMT1 und PRMT4 interagieren cytokinabhängig mit STAT5 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	94
5.2. Identifikation neuer Interaktionspartner von PRMT4.....	97
5.2.1. PRMT4 bildet höhermolekulare Komplexe	97
5.2.2. Vergleich der Komplexgröße von PRMT4 aus cytosolischen und nukleären Präparationen.....	99
5.2.3. Chromatographische Aufreinigung PRMT4-haltiger Komplexe – Strategie und Analyse	100
5.2.4. Coimmunpräzipitation und Identifikation von PRMT4-Interaktionspartnern	105
5.3. Verifizierung der Interaktionen zwischen PRMT4 und ALIX.....	108
5.3.1. Nachweis der Interaktion zwischen PRMT4 und ALIX in der Überexpression....	108
5.4. Analyse der Interaktion von PRMT4 mit Mi-2.....	110
5.4.1. Verifizierung der Interaktion zwischen PRMT4 und Mi-2 mittels Coimmunpräzipitation.....	110
5.4.2. Der N-Terminus und die Chromodomäne von Mi-2 α sind an der Interaktion mit PRMT4 beteiligt	111
5.4.3. PRMT4 interagiert nicht mit dem NuRD-Komplex	113
5.5. PRMT4 und Mi-2 interagieren mit dem Transkriptionsfaktor c-Myb	115
5.5.1. Mi-2 α und Mi-2 β interagieren mit c-Myb.....	115
5.5.2. PRMT4 interagiert mit c-Myb in der Überexpression und endogen.....	116
5.5.3. PRMT4 und c-Myb interagieren in einem <i>in-vitro</i> -Pulldown	117
5.6. PRMT4 und Mi-2 kooperieren in der c-Myb-abhängigen Genexpression	119
5.6.1. PRMT4 und Mi-2 aktivieren c-Myb-abhängige Zielgene in transformierten Makrophagen	119
5.6.2. Die katalytische Aktivität der Coaktivatoren ist essentiell für die Verstärkung der c-Myb-abhängigen Genexpression.....	122
5.6.3. PRMT4 kooperiert nicht mit PRMT1 in der c-Myb-vermittelten Genexpression	123
5.6.4. Auch das virale Oncogen v-Myb wird durch PRMT4 und Mi-2 coaktiviert	125
5.6.5. Der Enhancer und Promotor von mim-1 werden durch PRMT4 und Mi-2 aktiviert	127
5.6.6. PRMT4 und Mi-2 coaktivieren ein c-Myb-abhängiges Reportergen in HEK293 Zellen	128

5.6.7. In Fibroblasten kann C/EBP β nicht durch PRMT4 oder Mi-2 transkriptionell aktiviert werden	129
5.7. PRMT4 und Mi-2 regulieren c-Myb-Zielgene in hämatopoetischen Zellen	132
5.7.1. c-Myb, PRMT4 und Mi-2 werden in hämatopoetischen Zellen exprimiert	132
5.7.2. Die Depletion von PRMT4 und Mi-2 führt zur Deregulation von c-Myb-Zielgenen	133
5.7.3. PRMT4 und Mi-2 werden an die Promotoren c-Myb-abhängiger Gene rekrutiert	137
5.8. c-Myb, PRMT4 und Mi-2 in der Regulation der Proliferation und des Zellzyklus	140
5.8.1. c-Myb, PRMT4 und Mi-2 sind für die Proliferation von K562-Zellen in Methylcellulose wichtig	140
5.8.2. c-Myb, PRMT4 und Mi-2 korrelieren in der Regulation des Zellzyklus	144
5.9. Die Funktion von PRMT4 und Mi-2 in der Differenzierung hämatopoetischer Zellen	147
5.9.1. c-Myb, PRMT4 und Mi-2 werden mit der voranschreitenden erythroiden Differenzierung herunterreguliert	147
5.9.2. c-Myb, PRMT4 und Mi-2 sind für den Erhalt des undifferenzierten Zellstatus wichtig	150
6. Diskussion	152
6.1. PRMT1 und PRMT4 kooperieren in der IL-4-vermittelten Genexpression	153
6.1.1. PRMT1, PRMT4 und STAT5 regulieren die IL-4-induzierte Transkription von CITED2	153
6.1.2. Die CITED2-Genexpression wird durch vielseitige Stimuli induziert	154
6.1.3. CITED2 ist ein direktes Zielgen von PRMT1, PRMT4 und STAT5	155
6.1.4. Die Argininmethylierung kann durch Demethylasen revertiert werden	156
6.1.5. STAT5 und PRMT4 in der Tumorentstehung	157
6.2. Aufreinigung eines endogenen PRMT4 Komplexes	158
6.2.1. PRMT4 bildet höhermolekulare Komplexe	158
6.2.2. Es gibt keinen prädominanten PRMT4-Komplex	159
6.2.3. PRMT4 interagiert mit dem Chromatinremodeller Mi-2, aber nicht mit dem NuRD-Komplex	160
6.3. PRMT4 und Mi-2 kooperieren in der transkriptionellen Regulation	161

6.3.1. Mi-2 α und Mi-2 β als Aktivatoren der Transkription	161
6.3.2. PRMT4 und Mi-2 aktivieren kooperativ die c-Myb-vermittelte Genexpression.	162
6.3.3. Die katalytische Aktivität von PRMT4 und Mi-2 ist für die Coaktivatorfunktion essentiell.....	164
6.3.4. PRMT4 und Mi-2 sind direkte Regulatoren von c-Myb-Zielgenen.....	165
6.3.5. Mechanismen der Kooperation zwischen PRMT4 und Mi-2.....	166
6.3.6. PRMT1 kooperiert nicht mit PRMT4 in der c-Myb-vermittelten Genexpression	167
6.3.7. Die Funktion von C/EBP in der c-Myb-vermittelten mim-1-Expression.....	167
6.4. PRMT4 und Mi-2 sind biologisch relevant.....	168
6.4.1. PRMT4 und Mi-2 regulieren die Proliferation in einer hämatopoetischen Zelllinie	168
6.4.2. PRMT4 und Mi-2 sind an der Regulation der erythroiden Differenzierung beteiligt	169
6.4.3. PRMT4 und Mi-2 als Regulatoren von c-Myb in der Hämatopoese.....	170
6.4.4. PRMTs in der Entstehung von Leukämien.....	172
6.5. Modell für die Regulation der c-Myb-abhängigen Genexpression durch PRMT4 und Mi-2	172
7. Abkürzungsverzeichnis.....	174
8. Literaturverzeichnis	176
9. Anhang	195
9.1. Lebenslauf	195
9.2. Danksagung	197
9.3. Erklärung.....	198

1. Zusammenfassung

Die Proteinargininmethyltransferase PRMT4 ist als transkriptioneller Coaktivator an der regulierten Expression von Genen während der Ontogenese wichtig. Dabei trägt PRMT4 durch die Methylierung von Argininen im Histon H3 zum *Histoncode* bei und assoziiert mit weiteren Coaktivatoren, um mit diesen kooperativ die Transkription zu verstärken. Eine Kooperativität zwischen PRMT4 und einer weiteren PRMT, PRMT1, wurde bisher für wenige Transkriptionsfaktoren beschrieben und untersucht.

Dem ersten Teil dieser Arbeit lag der Befund einer Microarrayanalyse in HeLa-Zellen zu Grunde. Dieser zeigte, dass PRMT1 und PRMT4 nur dann eine Änderung des Genexpressionprofils hervorriefen, wenn sie zusammen wirkten. Die transkriptionelle Regulation der durch PRMT1 und PRMT4 kooperativ aktivierten Gene CITED2 und KRT8 wurde in der vorgelegten Arbeit genauer analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Cytokin IL-4 in HeLa-Zellen die Phosphorylierung und damit Aktivierung des STAT5- und STAT6-Signalweges sowie eine transkriptionelle Induktion von CITED2 und KRT8 bewirkt. Die IL-4-induzierte Transkription des CITED2-Gens war vom Transkriptionsfaktor STAT5 und den Coaktivatoren PRMT1 und PRMT4 abhängig. Anhand von ChIP-Analysen wurde eine Bindung von PRMT1 und PRMT4 sowie STAT5 an den CITED2-Promotor nach IL-4-Stimulation festgestellt. Die IL-4-induzierte Transkription von CITED2 ging mit der für die Coaktivatorfunktion von PRMT1 und PRMT4 typischen Argininmethylierungen von Histonen einher. Diese Befunde legten nahe, dass PRMT1 und PRMT4 die Transkription von CITED2 als direkte Coaktivatoren auf der Ebene des Promotors regulieren. Da PRMT1 und PRMT4 mit STAT5 in Abhängigkeit des IL-4-Stimulus interagierten, vermittelt STAT5 vermutlich die Zielgenspezifität der PRMTs für CITED2. In dieser Arbeit wurde damit erstmals eine direkte Coaktivatorfunktion von PRMTs in einem JAK-STAT-Signalweg belegt.

PRMT4 übt seine Funktion als Coaktivator durch die Interaktion mit anderen Proteinen oder innerhalb von Komplexen aus. Die Gelfiltrationsanalysen in dieser Arbeit deuteten darauf hin, dass PRMT4 in einem höhermolekularen Komplex vorliegt. Ziel des zweiten Teils der vorgelegten Arbeit war es daher neue Interaktionspartner von PRMT4 zu identifizieren, um bisher unbekannte Funktionen und Signalwege von PRMT4 aufzuzeigen. Die Isolierung endogener PRMT4-Komplexe mittels Ionenaustauscher-Chromatographie und einer anschließenden Affinitätsaufreinigung ermöglichte die massenspektrometrische Identifikation der Proteine Mi-2 α und ALIX als neue Interaktionspartner von PRMT4. Die

Interaktionen wurden jeweils anhand von unabhängigen Interaktionsstudien verifiziert. Es stellte sich außerdem heraus, dass auch das mit Mi-2 α verwandte Protein Mi-2 β mit PRMT4 interagiert. Da Mi-2 α/β (Mi-2) als Mitglieder der Familie der ATP-abhängigen Chromatinremodeller an der Regulation der Transkription beteiligt sind, ergab sich die Frage nach einer gemeinsamen Funktion mit PRMT4. Eine Assoziation von PRMT4 mit dem Repressorkomplex NuRD, in dem Mi-2 α und Mi-2 β als integrale Bestandteile auftreten, konnte auf Grund von CoIPs ausgeschlossen werden. Cotransfektions-Assays in der Hühnchen-Makrophagenzelllinie HD11 deckten eine Synergie von PRMT4 und den beiden Mi-2-Proteinen in der Aktivierung der c-Myb-vermittelten Transkription der Gene *mim-1* und *Lysozym* auf. Anhand RNAi-vermittelter Depletionen und ChIP-Analysen in der humanen erythroleukämischen Zelllinie K562 wurde nachgewiesen, dass die c-Myb-Zielgene *c-MYC* und *CDC7* einer aktivierenden und direkten transkriptionellen Regulation durch PRMT4 und Mi-2 unterliegen. Untersuchungen zur biologischen Relevanz der Proteine PRMT4 und Mi-2 in hämatopoetischen Zellen zeigten eine Korrelation mit den c-Myb-vermittelten Effekten auf die Proliferation, den Zellzyklus und die erythroide Differenzierung. Diese Ergebnisse, zusammen mit dem in dieser Arbeit erbrachten Nachweis der Interaktion zwischen c-Myb und PRMT4 bzw. der Mi-2-Proteine, decken PRMT4 und Mi-2 als kooperierende transkriptionelle Coaktivatoren von c-Myb auf. Die Daten lassen den Schluss zu, dass PRMT4 und Mi-2 Regulatoren c-Myb-vermittelter Funktionen sind und somit in die Erythropoese eingreifen.

2. Einleitung

2.1. Die Regulation chromatinvermittelter Prozesse

Das eukaryotische Genom ist als Chromatin organisiert. Dies ermöglicht die Kompaktierung und die Weitergabe der Erbinformation während der Zellteilung. Chromatin stellt außerdem ein Gerüst für die grundlegenden nukleären Prozesse wie die Replikation, Transkription und DNA-Reparatur dar. Chromatin, das in einer kondensierten Form vorliegt, wird als Heterochromatin bezeichnet. Euchromatin ist dekontensiertes Chromatin, das die regulierte Nutzung der Erbinformation erlaubt. Die kleinste Einheit des Chromatins ist das Nukleosom, welches aus 147 bp superhelikaler DNA, die um ein Oktamer aus den basischen Histonen H3, H4, H2A und H2B gewunden ist, besteht. Ein Tetramer aus jeweils zwei Molekülen H3 und H4 bildet mit zwei Dimeren aus H2A und H2B das Histonoktamer. Die Linker-DNA zwischen den einzelnen Nukleosomen ist zwischen 10 bis 90 bp lang. Viele Nukleosomen hintereinander bilden eine Struktur, die an eine Perlenkette erinnert und einen Durchmesser von 11 nm hat. Unter anderem durch den Einbau von Histon H1 assembliert die 11 nm-Faser in eine höherkondensierte 30 nm-Faser. Während der Mitose wird die 30 nm-Faser soweit verdichtet, bis ein 500 bis 750 nm Metaphasechromatid entstanden ist (Abb. 1).

Die Regulation der Transkription und anderer chromatinvermittelter Prozesse macht eine dynamische Kontrolle der Kondensation und Dekondensation des Chromatins erforderlich. Dabei wirken Histone regulierend. So können die Eigenschaften der Nukleosomen durch den Einbau spezieller Histonvarianten in das Histonoktamer verändert werden. Zum Beispiel enthält macroH2A eine zusätzliche globuläre Domäne am C-Terminus und ist im inaktivierten X-Chromosom der Säuger angereichert (Chadwick and Willard 2004). Die N-Termini der Histone sind unstrukturierte Domänen, die aus dem Nukleosom herausragen und zugänglich für postrtranslationale Modifikationen (PTM) sind (Abb. 1). Einzelne oder bestimmte Kombinationen von Histonmodifikationen ergeben den *Histoncode*, der für die Regulation chromatinabhängiger Prozesse verantwortlich ist (Jenuwein and Allis 2001). An den N-Termini der Histone H3 und H4 sowie an den N- und C-Termini von H2A, H2B und H1 wurden vielfältige posttranslationale Modifikationen nachgewiesen: Die Phosphorylierung von Serin und Threonin, Acetylierung von Lysinen, Methylierung von Lysinen und Argininen, Ubiquitinylierung und Sumoylierung von Lysinen, ADP-Ribosylierung, Biotinylierung, Glykosylierung und Carbonylierung (Reinberg et al. 2004; Margueron et al. 2005). Diese

Histonmodifikationen modulieren einerseits die elektrische Ladung der Histone und damit die DNA-Bindungseigenschaften. Andererseits sind Histonmodifikationen Bindestellen für spezialisierte Proteindomänen, die sogenannte „Reader“ des *Histoncodes* darstellen. Sie kommen in vielen chromatinassoziierten Proteinen vor und vermitteln somit die Rekrutierung von Proteinen und Proteinkomplexen an das Chromatin (Jenuwein and Allis 2001; Margueron et al. 2005).

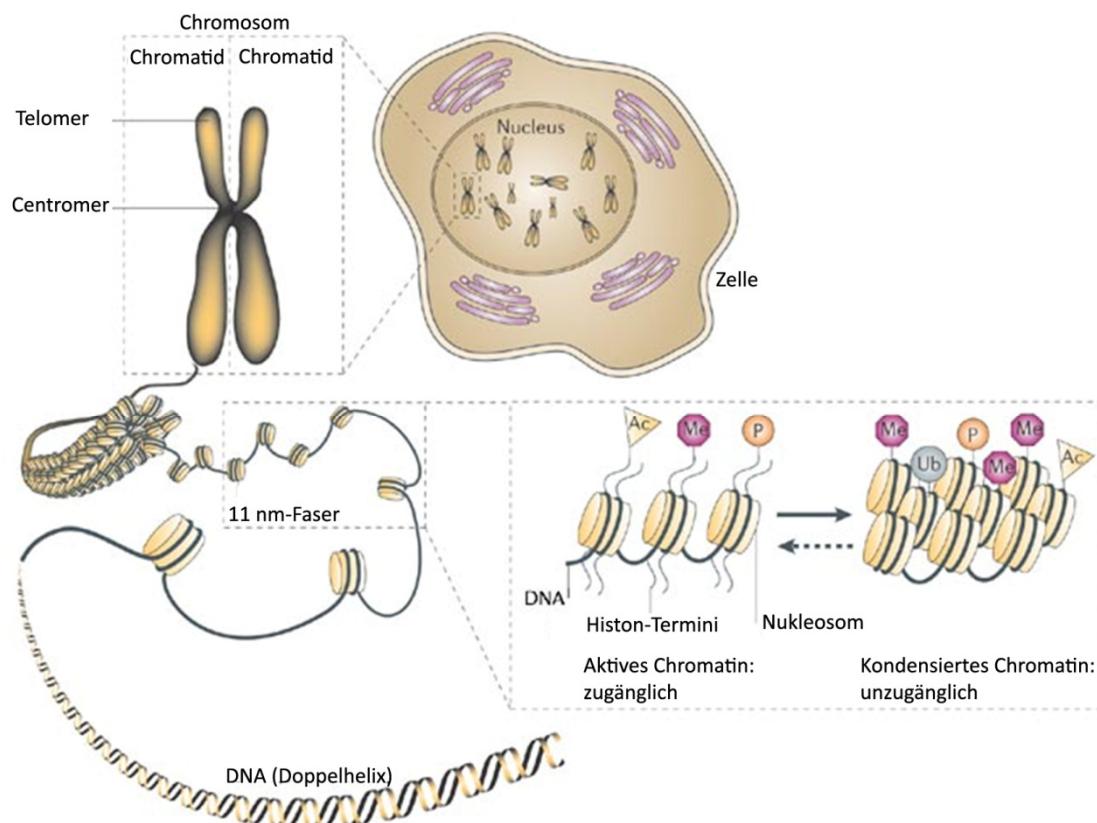


Abb. 1 Chromatinstruktur und Histonmodifikationen

Chromatinorganisation der DNA und Nukleosomen in die 11 nm „Perlenketten“-Struktur, Kondensation in die 30 nm Faser und weitere Verdichtung des Chromatins zu Prophase-Chromosomen. Die Kondensation und Dekondensation der Chromatinstruktur wird durch Histonmodifikationen an den Histon-N-Termini reguliert. Exemplarisch ist die Acetylierung (Ac), Methylierung (Me), Ubiquitinylierung (U) und Phosphorylierung (P) gezeigt (Sparmann and van Lohuizen 2006).

Bekannte PTM-bindende Domänen mit einer „Reader“-Funktion sind beispielsweise Bromo-, Chromo (*chromatin organization modifier*)-, Tudordomänen und PHD (*plant homeodomain*)-Finger. Bromodomänen sind Bindemodule acetylierter Lysine und kommen häufig in Proteinen vor, die transkriptionell aktivierend wirken. Methylierte Lysine werden typischerweise durch Chromodomänen, aber auch durch PHD-Finger und Tudor Domänen erkannt. Einige PHD-Finger binden bevorzugt unmethylierte Histon-N-Termini (Ruthenburg

et al. 2007). Eine Bindung von Tudordomänen an einige argininmethylierte Proteine, jedoch nicht an methylierte Arginine von Histonen, wurde außerdem beschrieben (Young et al. 2003; Cote and Richard 2005). Neben histonmodifizierenden Enzymen sind ATP-abhängige Chromatinremodeller entscheidende Regulatoren der Chromatinstruktur. Sie wirken mit Histonmodifikationen zusammen, da sie verschiedene PTM-bindende Domänen enthalten. Die Mitglieder dieser Enzymfamilie hydrolysieren ATP um die Bindung zwischen Histonen und DNA zu modulieren und somit die Zugänglichkeit regulatorischer DNA-Elemente, wie Promotoren, Enhancer oder Replikationsursprünge, zu ändern.

2.2. Die Familie der Chromatinremodeller

Die Mitglieder der Enzymfamilie der ATP-abhängigen Chromatinremodeller haben eine ATPase Domäne der SNF2 (*Sucrose non fermenting 2*)-Superfamilie der DNA-Helikasen/ATPasen gemeinsam. Die ATPase-enthaltenden Untereinheiten sind in Multiproteinkomplexen eingebettet. Die Remodellingaktivität dieser Komplexe können kleine Positionsänderungen der Nukleosomen, den Austausch von Histonen oder die Entfernung eines ganzen Nukleosoms bewirken. Die von der Hefe bis zu Menschen konservierten ATP-abhängigen Chromatinremodeller lassen sich auf Grund weiterer Proteindomänen in vier Familien unterteilen: In die SWI/SNF-, ISWI-, CHD- und INO80-Familie (Abb. 2).

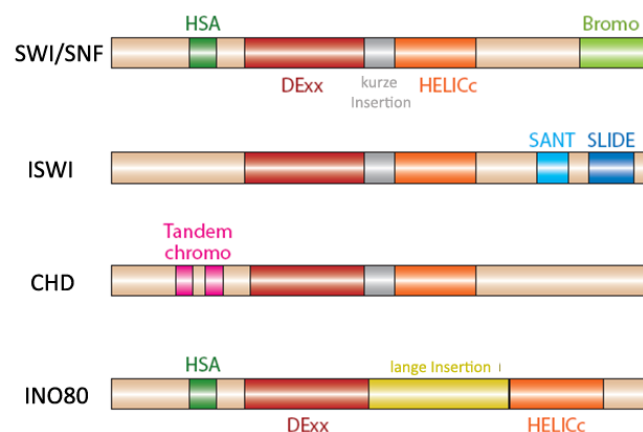


Abb. 2 Die Enzymfamilie der Chromatinremodeller

Die ATP-abhängigen Chromatinremodeller unterscheiden sich in ihren jeweils typischen Proteindomänen. Die Bromodomäne (grün), HSA (Helikase-SANT-Domäne, dunkelgrün) der SWI/SNF- bzw. INO80-Familie, die SANT-SLIDE-Domäne (blau) der ISWI-Familie, die Tandem Chromodomänen (pink) der CHD-Familie sind dargestellt. Jede Familie enthält eine SNF2-ähnliche ATPase Domäne, die aus zwei Subdomänen besteht (DExx in rot, HELICc in orange). Charakteristisch für INO80 ist die durch eine lange Insertion geteilte ATPase-Domäne (Clapier and Cairns 2009).

Die verschiedenen Proteindomänen der Remodellerproteine vermitteln die Interaktion mit den Nukleosomen oder der DNA, binden bestimmte Histonmodifikationen, interagieren mit anderen chromatinassoziierten Faktoren oder Transkriptionsfaktoren und wirken regulatorisch auf die ATPase-Funktion.

2.2.1. Die Familie der SWI/SNF-Remodeller

SWI/SNF: SWI/SNF (*mating type switching/sucrose non-fermenting*) wurde ursprünglich aus *Saccharomyces cerevisiae* aufgereinigt und enthält 8 bis 14 Untereinheiten. In der Hefe, in *Drosophila* und im Menschen unterscheidet man zwei überwiegende SWI/SNF-Komplexe. Der humane BAF (*BRG1/BRM associated Factors*)-Komplex enthält die ATPase-Untereinheiten BRG1 (*Brahma related gene*) oder hBRM (Brahma), der humane PBAF (*Polybromo associated factors*)-Komplex enthält BRG1 zusammen mit den Polybromo-assoziierten Faktoren (PBAF), (Sif et al. 2001; Gangaraju and Bartholomew 2007). Dennoch wird die funktionelle Spezifität und Aktivität der SWI/SNF-Komplexe durch die Assoziation mit zusätzlichen Sub-Komplexen und gewebs- oder entwicklungsspezifischen Proteinen, wie dem Repressorkomplex Sin3A/HDAC oder Proteinargininmethyltransferasen (PRMTs) reguliert (Sif et al. 2001; Pal et al. 2003; Xu et al. 2004). Die SANT (SWI3, ADA2, NCoR, TFIIIB)-Domäne im N-Terminus der SWI/SNF-Remodeller bindet unmodifizierte Histontermini und ist für die Funktion einiger SWI/SNF-Remodeller wichtig (Boyer et al. 2002). In *Drosophila* ist Brahma für die Transkriptionsinitiation der meisten Gene der polytären Chromosomen nötig (Armstrong et al. 2002). In der *S. cerevisiae* wird SWI/SNF für das Silencing von Telomeren benötigt (Dror and Winston 2004). Humanes BRM ist außerdem mit der Regulation der Wechselwirkung von RNA-Polymerase II mit Splicing-Faktoren in Verbindung gebracht worden (Batsche et al. 2006).

2.2.2. Die CHD-Familie

Die neun Mitglieder der CHD-Familie (*chromodomain, helicase, DNA binding*) sind neben der SNF2-like ATPase-Domäne durch eine Tandem-Chromodomäne im N-Terminus charakterisiert. Einige Mitglieder enthalten im C-Terminus eine DNA-bindende Domäne, die AT-reiche DNA-Abschnitte binden kann (Marfella and Imbalzano 2007). Für die Chromodomäne von CHD1 wurde eine Bindung an di- und trimethyliertes H3K4, eine Histonmodifikation die an aktiv transkribierten Genen vorkommt, gezeigt (Flanagan et al.

2005). In Übereinstimmung damit wurde CHD1 als positiver Regulator der Elongation beschrieben (Simic et al. 2003).

Mi-2 α und Mi-2 β (CHD3 und CHD4) haben keine DNA-Bindedomäne und stellen auf Grund einer zusätzlichen Domäne paariger PHD-Finger im N-Terminus eine eigene Subfamilie der CHD-Remodeller dar (Marfella and Imbalzano 2007). Obwohl beide Proteine mit der transkriptionellen Repression in Verbindung gebracht wurden, gibt es einige Beispiele für eine Coaktivatorfunktion (Hall and Georgel 2007). In Menschen wurden beide Proteine als Autoantigene in Patienten mit Dermatomyositis, einer entzündlichen Erkrankung des Muskels und der Haut, identifiziert (Seelig et al. 1995; Seelig et al. 1996). CHD3 aus *Drosophila* ist eine trunkierte Version des dMi-2, da der N- und der C-Terminus fehlen. dCHD3 liegt als Monomer vor und bleibt im Gegensatz zu dMi-2 an mitotischen Chromosomen assoziiert. dCHD3 und dMi-2 sind in der Sumo-vermittelten Repression eines Reportergens beteiligt, sind aber auch mit RNA-Pol II während der Elongation an polytären Chromosomen assoziiert (Murawska et al. 2008; Stielow et al. 2008).

2.2.3. Mi-2 ist Bestandteil des NuRD-Komplexes

Mi-2 α und β sind jeweils als Untereinheiten eines makromolekularen Komplexes mit repressorischer Funktion, dem NuRD (*Nucleosomal Remodeling and Deacetylation*)-Komplex beschrieben (Abb. 3). Verschiedene Versionen des NuRD-Komplexes wurde aus *Drosophila*, dem Krallenfrosch und verschiedenen humanen Zelllinien aufgereinigt (Tong et al. 1998; Wade et al. 1998; Xue et al. 1998; Zhang et al. 1998b). Der NuRD-Komplex verbindet nucleosomales Remodelling mit histondeacetylierender Aktivität. Die Remodeller-Aktivität wird dabei durch Mi-2, und die histondeacetylierende Funktion von HDAC1 und 2 (*Histon Deacetylases*) vermittelt. Die für Mi-2 α und Mi-2 β typischen PHD-Finger sind an der Interaktion mit HDAC1 und HDAC2 und vermutlich auch an der Rekrutierung des NuRD-Komplexes ans Chromatin beteiligt (Zhang et al. 1998b; Musselman et al. 2009). Als weitere integrale Bestandteile des NuRD-Komplexes wurden RbAp46 und 48, MTA1, 2 oder 3 (*metastasis-associated proteins*) und die MBD-Proteine MBD2 oder 3 (*methyl CpGbinding domain proteins*) identifiziert (Denslow and Wade 2007). Es gibt Hinweise, dass MBD2 die Bindung von NuRD an methylierte DNA vermittelt und somit das Silencing von Genen bewirkt (Feng and Zhang 2001).

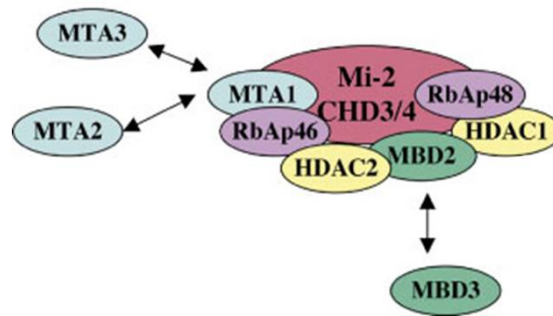


Abb. 3 Der NuRD-Komplex

Die Untereinheiten des NuRD-Komplexes sind dargestellt. Die Zusammensetzung des NuRD-Komplexes variiert. Mi-2 α oder Mi-2 β (CHD3 oder CHD4) sind im NuRD-Komplex enthalten. Entweder MBD2 oder MBD3 bzw. eines der MTA-Proteine sind Bestandteil eines Komplexes (Pal and Sif 2007).

Die Spezifität der Repressorfunktion des NuRD-Komplexes für bestimmte Genloci wird durch die Assoziation mit sequenzspezifischen Repressorproteinen oder Transkriptionsfaktoren vermittelt. Eine der ersten Publikation, die eine Bindung eines Mi-2 α enthaltenden NuRD-Komplexes an einen Repressor beschrieb, deckte mit einem *Two-Hybrid-Assay* die Interaktion zwischen dem Corepressor KAP-1 und dem C-Terminus von Mi-2 α auf. KAP-1 selbst wird von einem sequenzspezifischen Repressor, KRAB (*Kruppel-associated box*), an das Chromatin lokalisiert (Schultz et al. 2001). Für den transkriptionellen Repressor NAB1 wurde gezeigt, dass er die transkriptionelle Repression von EGR (*early growth response*)-Zielgenen durch die Rekrutierung von HDAC-Aktivität vermittelt, indem er mit den C-terminalen Domänen von Mi-2 α und Mi-2 β interagiert (Srinivasan et al. 2006). In Lymphozyten interagieren die Zink-Finger DNA-Bindefaktoren Ikaros und Helios mit dem NuRD-Komplex und vermitteln somit die Repression bestimmter Zielgene (Kim et al. 1999; Sridharan and Smale 2007).

In *Drosophila* liegt der Großteil an dMi-2 nicht im NuRD-Komplex vor, sondern in dem kürzlich identifizierten dMec (*Drosophila MEP-1 containing complex*)-Repressor-Komplex. Dieser ist für die Repression von proneuralen Genen während der neuronalen Entwicklung verantwortlich (Kunert et al. 2009).

2.3. Die Enzymfamilie der Proteinargininmethyltransferasen (PRMTs)

2.3.1. Die Methylierung von Argininen

Die Methylierung der terminalen Stickstoffatome der Guanidinogruppe von L-Argininen ist in Säugerzellen eine der häufigsten Methylierungsreaktionen von Proteinen (Paik 1980; Najbauer et al. 1993). Einerseits ersetzt die Methylierung ein Wasserstoffatom der Guanidinogruppe des Arginins und vermindert somit das Potential des Arginins Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Andererseits vermindert die Methylierung die Hydrophilität der Aminosäure und verstärkt die Affinität zu aromatischen Ringen durch Kationen-Pi-Interaktionen (Mitchell et al. 1992; Hughes and Waters 2006). Diese posttranslationale Modifikation verändert daher die Bindungseigenschaften von Proteinen und moduliert die Wechselwirkung zwischen Proteinen bzw. Proteinen und Nukleinsäuren. (Calnan et al. 1991; Luscombe et al. 2001). Die Methylierung von Argininen wurde in einer großen Anzahl verschiedener Proteine nachgewiesen. Diese umfassen sowohl nukleäre Histonproteine und Nicht-Histonproteine als auch cytoplasmatische Proteine (Pahlich et al. 2006). Die Argininmethylierung von Histonen ist, wie auch die Lysinmethylierung, eine epigenetische Markierung am Chromatin, die zum *Histoncode* beiträgt und somit die Expression der genomischen Information steuert.

2.3.2. Struktur und Katalyse der Proteinargininmethyltransferasen (PRMTs)

Die Enzymfamilie der Proteinargininmethyltransferasen (PRMTs) katalysiert die Methylierung von Argininen. Sie ist von der Hefe bis zum Menschen konserviert, unterscheidet sich jedoch in den verschiedenen Organismen in der Anzahl ihrer Mitglieder. Die erste Proteinargininmethyltransferase wurde 1968 von Paik und Kim aus Kalbsthymus isoliert (Paik and Kim 1968; Ghosh et al. 1988; Rawal et al. 1994). Die Klonierung der entsprechenden cDNA-Sequenz aus Säugergewebe erfolgte etwa 30 Jahre später parallel durch drei Arbeitsgruppen (Henry and Silver 1996; Lin et al. 1996; Abramovich et al. 1997). PRMT1 wird in Säugern als die vorherrschende PRMT angesehen, da diese für einen großen Anteil der gesamten Argininmethylierung in ES-Zellen, RAT1 Fibroblastenzellen und auch in Geweben von Mäusen verantwortlich ist (Pawlak et al. 2000; Tang et al. 2000). Inzwischen weiß man, dass die PRMT-Familie in Säugern 11 Mitglieder umfasst, wobei für PRMT1 bis PRMT9 eine katalytische Aktivität nachgewiesen wurde, es sich jedoch bei PRMT10 und PRMT11 um putative PRMT-Gene handelt (Krause et al. 2007; Wolf 2009). Die Länge der

PRMT-Proteine variiert zwischen 316 und 956 Aminosäuren (Abb. 4). Die PRMT-Mitglieder unterscheiden sich untereinander in ihrer N-terminalen Domäne, deren Länge variabel ist. PRMT4 hat einen einzigartigen C-Terminus, der für die Funktion von PRMT4 essentiell ist (Teyssier et al. 2002). Einige Mitglieder der Familie enthalten außerdem typische Interaktionsdomänen (Abb. 4). PRMTs sind sowohl cytosolisch als auch nukleoplasmatisch lokalisiert. PRMT8 ist die einzige membranständige PRMT, da das Protein an seinem N-Terminus myristoyliert und darüber an die Membran assoziiert wird (Lee et al. 2005). Alle PRMTs haben eine zweiteilige katalytische Domäne von 310 AS gemeinsam (*Core-Region*, grün und gelb), (Abb. 4). PRMT7 und PRMT10 enthalten eine zweite katalytische Domäne, die vermutlich auf eine Gendublikation zurückzuführen ist (Miranda et al. 2004; Krause et al. 2007).

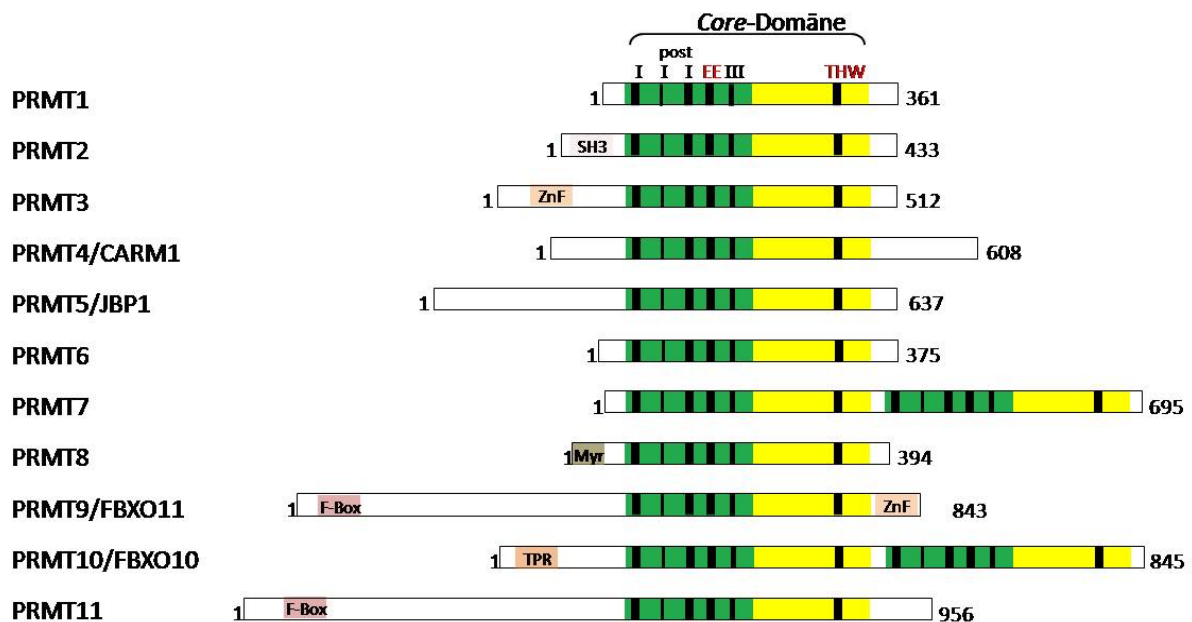


Abb. 4 Die Proteinfamilie der PRMTs

Die Familienmitglieder der PRMTs mit den entsprechenden Proteinlängen sind dargestellt. Die längsten Isoformen der PRMTs sind jeweils gezeigt. Die grünen Boxen stellen die SAM-Bindendomäne und die gelben Boxen die für PRMTs einzigartige β-Fass-Domäne der konservierten, zweigeteilten katalytischen Domäne dar. Die Sequenzmotive I, Post I, II, III sowie der *Double-E-loop* und die *THW-loop* sind eingezeichnet. Zusätzliche Domänen der PRMTs sind dargestellt: SH3 (*Src-homology 3-Domäne*), ZnF (Zinkfinger), TPR (Tetratricopeptid), F-Box, Myr (Myristoylierungsstelle). Verändert nach (Wolf 2009).

Die Struktur der katalytischen Domäne wurde anhand röntgenkristallographischer Studien von HMT1 (Hefe), PRMT1, PRMT3 und PRMT4 aufgeklärt (Weiss et al. 2000; Zhang et al. 2000; Zhang and Cheng 2003; Troffer-Charlier et al. 2007b; Yue et al. 2007), (Abb. 5 A). Die N-terminale *Core-Domäne* (grün), welche die innerhalb der Methyltransferasen der Klasse I

hochkonservierten Sequenzmotive I, Post I, II und III enthält (Cheng et al. 2005), bildet eine Rossmann-Falte aus (Abb. 5 A). Dabei handelt es sich um eine typische Struktur von SAM-Bindedomänen der Methyltransferasen. Die Rossmann-Falte der N-terminalen *Core*-Domäne und die β -Fass-Struktur (gelb) der C-terminalen *Core*-Domäne sind in ihrer Gesamtstruktur der PRMTs so gefaltet, dass zwischen ihnen eine saure Furche ausgebildet wird. In deren Mitte befindet sich eine tiefe saure Tasche, in die das Arginin inseriert und welche die Substrat-Bindedomäne darstellt. Der *double-E-loop* mit den zwei invarianten Glutamatresten (E) innerhalb der SAM-Bindedomäne und der *THW-loop* mit den konservierten Aminosäuren Threonin (T), Histiden (H) und Tryptophan (T) innerhalb der C-terminalen *Core*-Region ragen in die saure Furche hinein und sind an der Ausbildung des aktiven Zentrums beteiligt.

Die Strukturanalyse der PRMTs belegte außerdem die strukturelle Konservierung einer helikalen Struktur in der C-terminalen *Core*-Domäne, die für die Dimerisierung essentiell ist (Abb. 5 A). Der Dimerisierungsarm eines Monomers interagiert mit der Rossmann-Falte der N-terminalen *Core*-Domäne des anderen Monomers und bildet dabei eine ringförmige Struktur mit einer zentrale Höhle (Abb. 5 B). Die Bildung von Homodimeren ist unter den PRMTs konserviert und für die Methyltransferaseaktivität essentiell, da die Deletion des Dimerisierungsarmes zu einem Verlust der katalytischen Aktivität führt. Es wurde vermutet, dass der Cofaktor SAM nicht mehr gebunden werden kann (Zhang and Cheng 2003).

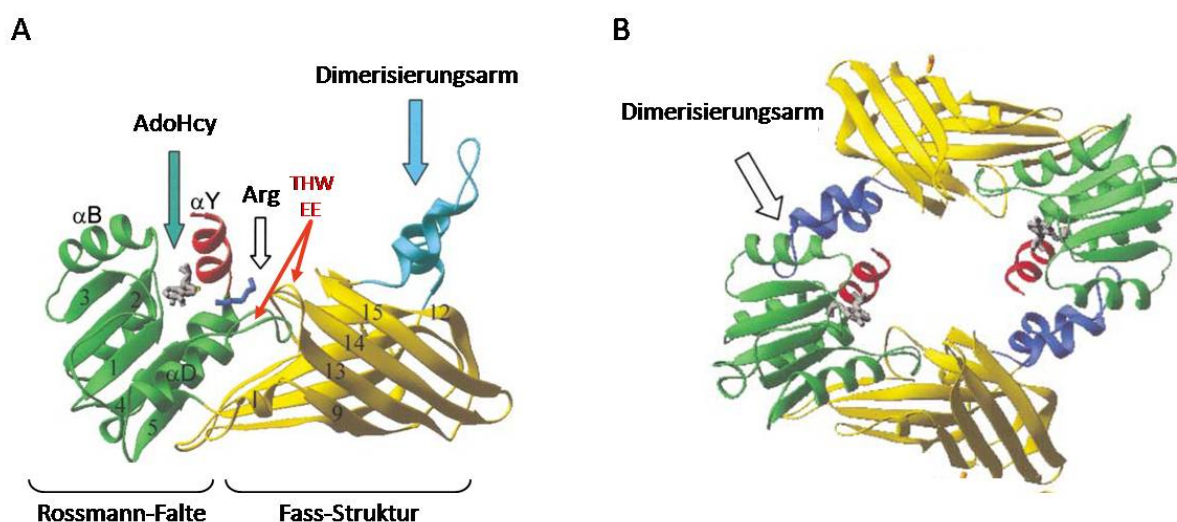


Abb. 5 Die Monomere und dimere Struktur von PRMT1

A. Kokristallisation von PRMT1 in einem ternären Komplex mit Adenosylhomocystein (AdoHcy) und RGG-Peptiden (Arg). Die N-terminale Helix ist in rot, die SAM-Bindedomäne in grün mit gebundenem AdoHcy dargestellt. Die β -Fasstruktur ist gelb, der Dimerisierungsarm blau. Der THW- und *double E*-Loop im katalytischen Zentrum sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. **B.** Gleicher Farbcode wie in A. Darstellung des ringförmigen Homodimers von PRMT1 (Zhang and Cheng 2003).

Bei der Methylierungsreaktion wird eine Methylgruppe des Methylgruppendonors S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) unter Freisetzung von S-Adenosyl-L-Homocysteine (AdoHcy) auf das terminale Stickstoffatom der Guanidinogruppe des Arginins übertragen (Abb. 6). PRMTs lassen sich anhand der Art der Methylierung in zwei Gruppen einteilen, Typ-I oder Typ-II (Abb. 6). Beide Typen katalysieren die Bildung von monomethyliertem Arginin (omega-NG-monomethyl-Arginin, MMA). In Säugern sind ungefähr 2 % der Arginine aus nukleären Proteinen dimethyliert (Boffa et al. 1977). Am häufigsten kommt die asymmetrische Dimethylierung von Argininen vor, die durch PRMTs des Typ I katalysiert wird. Dabei werden zwei Methylgruppen auf ein terminales Stickstoffatom der Guanidinogruppe übertragen (omega-N^G, N^G-dimethyl-Arginin, ADMA). Die meisten PRMTs gehören dieser Gruppe an (Abb. 6). Wird jeweils eine Methylgruppe auf beide terminalen Stickstoffatome übertragen, handelt es sich um eine symmetrische Dimethylierung (omega-N^G, N^G-dimethyl-Arginin, SDMA). Die Methylierungsreaktion wird durch den Typ II der PRMTs, zu der PRMT5, 7 und PRMT9 gehören, katalysiert (Paik 1980; Wolf 2009).

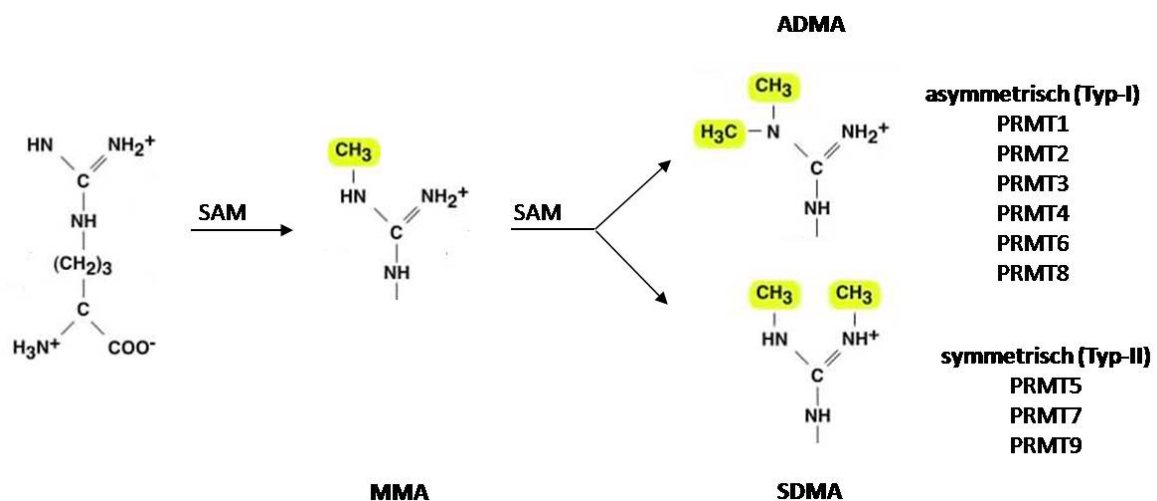


Abb. 6 Methylierung der Arginin-Seitenketten durch PRMTs

PRMTs des Typ-I und Typ-II katalysieren die Bildung von MMA durch Transfer einer Methylgruppe vom Methylgruppendonor S-Adenosyl-Methion (SAM) auf das ω -Stickstoffatom der Guanidinogruppe des Arginins. PRMT1, 2, 3, 4, 6 und 8 dimethylieren Arginine asymmetrisch, indem eine Methylgruppe auf das monomethylierte Stickstoffatom übertragen wird. Bei der symmetrischen Methylierung durch Typ-II der PRMTs wird das zweite terminale Stickstoffatom der Guanidinogruppe methyliert (modifiziert nach Bedford and Richard 2005).

2.3.3. Substrate der PRMTs

PRMT1 sowie andere PRMTs des Typ-I bevorzugen Arginine innerhalb von Glycin-Argininreichen (GAR) Regionen wie sie häufig in RNA und DNA-bindenden Proteinen vorkommen

(Najbauer et al. 1993). PRMT4 stellt eine Ausnahme dar, da es für dieses Enzym keine Konsensussequenz für die Methylierung gibt. PRMTs des Typ-II bevorzugen ebenfalls GAR-Motive, können aber auch isolierte Arginine methylieren, die nicht innerhalb einer Konsensussequenz auftreten. Für PRMT4 und PRMT5 wurde darüber hinaus gefunden, dass sie Arginine in der Umgebung von Prolin-Glycin-Methionin-Motiven (PGM-Motiven) methylieren, die häufig in Splicingfaktoren vorkommen (Cheng et al. 2007).

2.3.4. Funktionen der PRMTs – Studien von PRMT-*knock-out* Mäusen

Die biologische Relevanz und die nicht-redundanten Funktionen der verschiedenen PRMTs werden anhand der Phänotypen der *knock-out*-Mäuse deutlich.

PRMT1 (-/-): Der homozygote *knock-out* von PRMT1 in Mäusen führt zu einer frühen embryonalen Lethalität ab E6.5. PRMT1 ist jedoch nicht essentiell für die Zellviabilität von ES-Zellen (embryonalen Stammzellen), (Pawlak et al. 2000). Der konditionale *knock-out* von PRMT1 in MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) führt zu DNA-Schaden, verzögertem Durchlaufen des Zellzyklus, *checkpoint*-Defekten und Veränderungen im Chromosomensatz (Yu et al. 2009).

PRMT2 (-/-): Die Mäuse sind überlebensfähig. PRMT2 wirkt mit dem Retinoblastoma (RB) Protein in der Repression der E2F-vermittelten Genexpression zusammen. *Knock-out* MEFs haben eine beschleunigte G1/S-Phase (Yoshimoto et al. 2006) sowie eine erhöhte NFκB-Aktivität und Resistenz gegenüber Apoptose (Ganesh et al. 2006).

PRMT3 (-/-): Die PRMT3 (-/-) Mausembryonen sind überlebensfähig und in ihrer Größe kleiner als der Wildtyp, erreichen jedoch eine normale Körpergröße im Erwachsenenalter. Im Rahmen dieser Studie wurden ribosomale Proteine und mit Ribosomen assoziierte Proteine als Substrate von PRMT3 identifiziert (Swiercz et al. 2007).

PRMT4 (-/-): Die PRMT4 (-/-) Mäuse sind kleiner als wildtypische Mäuse und sterben kurz nach der Geburt auf Grund eines Lungendefektes (Yadav et al. 2003). Auf zellulärer Ebene haben PRMT4-*knock-out* MEFs einen Defekt in der Expression Estrogenrezeptor- und NFκB-abhängiger Zielgene (Yadav et al. 2003; Covic et al. 2005; Yadav et al. 2008).

2.3.5. Zelluläre Funktionen der PRMTs

Auf Grund ihrer Substratvielfalt sind PRMTs an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Sie regulieren die Transkriptionsinitiation und Elongation, die Stabilität, Prozessierung, Lokalisation und Translation von RNA, die virale Replikation, Signaltransduktionsprozesse, DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen und die Basen-Exzisions-Reparatur sowie die Proliferation von Zellen. In dieser Arbeit wurde die transkriptionelle Regulation eines Signalweges durch eine PRMT aufgedeckt und eine neue transkriptionelle Aktivatorfunktion für einen Regulator der Hämatopoese beschrieben. Daher wird nun besonders auf die Rolle der PRMTs in der Transkription und in der Signaltransduktion eingegangen.

Transkription: PRMTs können aktivierend oder reprimierend auf die Transkription wirken. Die transkriptionelle Regulation durch PRMTs ist mit der spezifischen Methylierung von Histonen verbunden. Darüber hinaus methylieren und regulieren sie die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren.

Transkriptionelle Aktivierung: PRMT1 und PRMT4 sind transkriptionelle Coaktivatoren für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise nukleäre Hormonrezeptoren (NR), YY1, E2F und p53. Die asymmetrische Dimethylierung von Histon H4 am R3 durch PRMT1 (Strahl et al. 2001; Wang et al. 2001a; Wang et al. 2001b) und von Histon H3 am R17 und R26 durch PRMT4 (Ma et al. 2001; Bauer et al. 2002) gehen mit der transkriptionellen Aktivatorfunktion von PRMT1 und PRMT4 einher. Bisher sind allerdings keine Bindedomänen für diese Histonmodifikationen bekannt. PRMT4 methyliert außerdem Coaktivatoren und moduliert damit deren Funktion. Zum Beispiel verhindert die Methylierung von Argininen der Histonacetyltransferase CBP in der KIX-Domäne des Proteins die Bindung von CREB (*cAMP response element-binding protein*) und hemmt somit den cAMP-Signalweg (Xu et al. 2001). Andererseits verstärkt PRMT4 die Coaktivatorfunktion von CBP für nukleäre Hormonrezeptoren (NR) durch die Methylierung von Argininen außerhalb der KIX-Domäne (Chevallard-Briet et al. 2002; Wei et al. 2003). Einen direkten aktivierenden Einfluss übt PRMT1 auf Transkriptionsfaktoren aus. Beispielsweise verstärkt die Methylierung von HNF4 (*hepatic nuclear factor 4*) dessen Affinität zu den DNA-Bindestellen (Barrero and Malik 2006). Die Methylierung von RUNX1 bewirkt die Dissoziation des transkriptionellen Repressors SIN3A und bewirkt damit die transkriptionelle Aktivierung von RUNX1 (Zhao et al. 2008).

Transkriptionelle Repression: Die symmetrische Dimethylierung von Histon H3 am R8 und Histon H4 am R3 wurde überwiegend mit der Funktion von PRMT5 als transkriptioneller Repressor in Verbindung gebracht (Pal et al. 2004). Am β -Globinlokus zum Beispiel, zieht die Modifikation von H4R3 durch PRMT5 die Rekrutierung der DNA-Methylase DNMT3A nach sich (Zhao et al. 2009). PRMT5 interagiert mit vielen verschiedenen Transkriptionsfaktoren oder Repressorkomplexen, wie zum Beispiel BRG1 und hBRM, Blimp1 und Snail (Pal et al. 2003; Ancelin et al. 2006; Hou et al. 2008). In wenigen Fällen wirkt PRMT5 als transkriptioneller Aktivator. So ist PRMT5 für die Expression von *Myog* während der Muskeldifferenzierung wichtig (Dacwag et al. 2007). Die asymmetrische Dimethylierung von H3 am R2 durch PRMT6 wurde ebenfalls als transkriptionell reprimierend beschrieben (Guccione et al. 2007; Hyllus et al. 2007). Diese Histonmodifikation verhindert die Etablierung der H3K4-Trimethylierung durch den transkriptionellen Aktivorkomplex MLL1 und reguliert die Expression einiger Hox-Gene während der Differenzierung neuronaler Zellen (Hyllus et al. 2007; Iberg et al. 2008). PRMT7 trägt während des *Imprintings* zum *Histoncode* bei. Das Protein bindet mit dem Insulatorprotein CTCF an die ICR (*imprinting control region*) und katalysiert die symmetrische Dimethylierung von H4R3, die wiederum Rekrutierung von DNA-Methyltransferase in dieser Region bewirkt (Jelinic et al. 2006).

Elongation: Die Methylierung des Elongationsfaktors SPT5 durch PRMT1 und PRMT5 inhibiert die Assoziation zwischen SPT5 und der Promotor gebundenen RNA-Polymerase II und vermindert damit die transkriptionelle Elongation (Kwak et al. 2003).

Posttranskriptionelle Regulation: RNA-bindende Proteine (RBP), wie snRNPs und hnRNP (*small nuclear* und *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*), enthalten 60 % der im Nukleus vorkommenden ADMAs und sind für die richtige Prozessierung, Faltung, Stabilisierung und Lokalisierung von RNA wichtig (Boffa et al. 1977). Für die Ribosomenbiogenese ist die Methylierung des ribosomalen Proteins S2 in der Hefe und in Säugern relevant (Swiercz et al. 2005; Swiercz et al. 2007).

Signaltransduktion: PRMTs modulieren die Signaltransduktion der Cytokin-, T-Zell-, $\text{TNF}\alpha$ -, Toll-Like-, nukleärer Hormon- und NGF-Rezeptoren (*nerve growth factor*). Die Argininmethylierung ist an der Regulation der Immunität und der T-Zellaktivierung beteiligt. Während der Differenzierung von T-Zellen wird der Transkriptionsfaktor NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*) durch Aktivierung des TCR (*T-cell-receptor*) und des costimulatorischen Rezeptors CD28 in den Nukleus lokalisiert. Die PRMT1-abhängige

Methylierung von NIP45, einem Coaktivator von NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*), ist für die Interaktion zwischen NF-AT und NIP45 und für die NF-AT getriebene Expression der Cytokingene IL-4 und IFN γ wichtig. (Boisvert and Richard 2004; Mowen et al. 2004). Antigen präsentierende Zellen sind spezialisierte Zellen des Immunsystems, die den MHC-II-Komplex exprimieren und darüber körperfremde Antigene an CD4⁺Zellen präsentieren. Es wurde gezeigt, dass PRMT4 die IFN γ -induzierte Transkription des MHC-II-Gens durch den Transkriptionsfaktor CIITA verstärkt (Zika et al. 2005).

Da in dieser Arbeit eine neue Funktion von PRMT1 und PRMT4 im JAK-STAT-Signalweg aufgedeckt wurde, wird nun genauer auf die Rolle der PRMTs in diesem Signalweg eingegangen. Die 7 Mitglieder (STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B und STAT6) umfassende Proteinfamilie der STATs (*signal transducer and activators of transcription*) werden von verschiedenen Cytokinen, wie Interferonen, Interleukinen sowie durch Wachstumsfaktoren aktiviert und tragen zur Zellentwicklung, Wachstumskontrolle und Zellhomöostase bei. PRMTs sind mit der Regulation des JAK-STAT-Signalweges auf der Ebene der Cytokinrezeptoren, der JAKs (Janus Kinasen) und der STATs in Verbindung gebracht worden (Abb. 7).

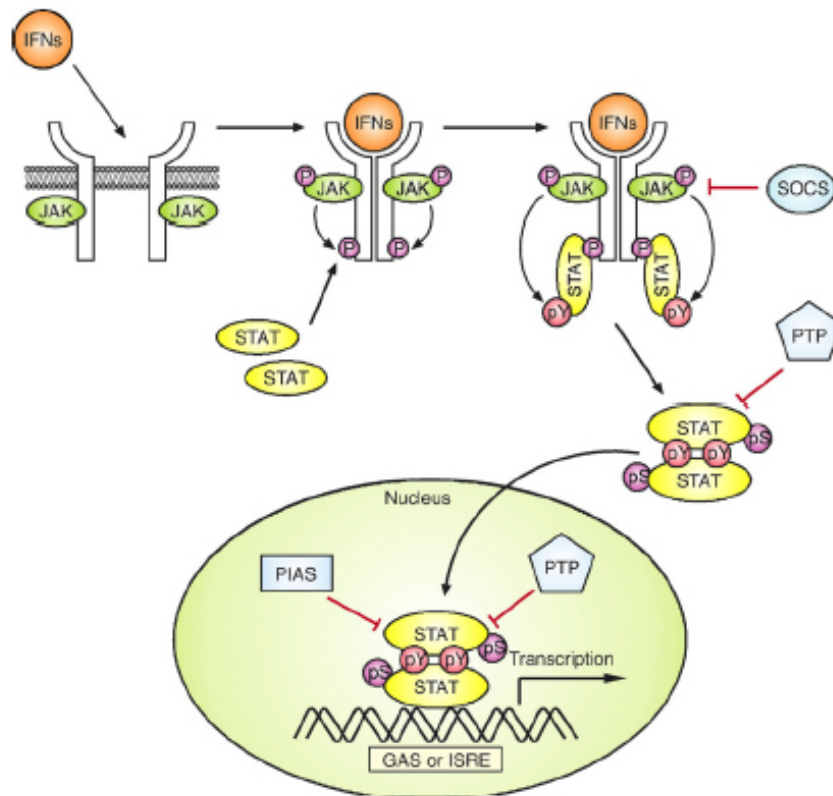


Abb. 7 Darstellung des JAK-STAT-Signalweges

Interleukine und Interferone (IFN) aktivieren den JAK-STAT-Signalweg durch Bindung an membranständige Cytokinrezeptoren, die nach der Ligandbindung dimerisieren. Dies bewirkt die Autophosphorylierung und Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Janus Kinasen (JAK). JAKs phosphorylieren konservierte Tyrosin-Reste in den cytoplasmatischen Domänen der Cytokinrezeptoren. STATs (*signal transducer and activator of transcription*) binden an die Rezeptoren und werden ihrerseits phosphoryliert. Durch eine reziproke SH2-Phosphotyrosin-Interaktion dimerisieren STATs, werden in den Nukleus transportiert und binden dort an γ -activated sites (GAS) oder IFN-stimulated response-Elemente (ISRE). Der JAK-STAT-Signalweg wird unter anderem durch Phosphatasen (PTP), cytokinininduzierte Kinaseinhibitoren (*suppressor of cytokine signalling* – SOCs) und PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*) negativ reguliert (Levy and Darnell 2002).

Einer der ersten Hinweise, dass PRMTs einen Einfluss auf JAK-STAT-Signalweg haben, war der Nachweis der direkten Interaktion zwischen PRMT1 und der intracytoplasmatischen Domäne des Interferon- α , β -Rezeptors 1 (IFNAR1). Eine antisensevermittelte Depletion von PRMT1 führte zu einer erhöhten Resistenz gegenüber einer IFN- β -induzierten Wachstuminhibition und zu einer Inhibition der antiviralen Wirkung von IFN- β (Abramovich et al. 1997; Altschuler et al. 1999). Ein anderer Mechanismus von PRMT1 im IFN-Signalweg wurde vor kurzem aufgedeckt. Es wurde gezeigt, dass PIAS1 nach IFN γ -Stimulation durch PRMT1 methyliert wird und dass diese Methylierung essentiell für die PIAS1-vermittelte Abschaltung des STAT1-Signalweges ist. Der Verlust von PIAS1 oder PRMT1 verstärkte die

antiproliferative von IFN γ (Weber et al. 2009). Neben PRMT1 trägt PRMT5 zur Regulation des JAK-STAT-Signalweges bei. PRMT5 wurde ursprünglich als Janus Kinase bindendes Protein (JBP1) in einem *Two-Hybrid Screen* identifiziert (Pollack et al. 1999). PRMT5 beeinflusst die IL-4-vermittelte Aktivierung des STAT6-Signalweges positiv und trägt zur Regulation des Ig-Klassenwechsels in B-Zellen bei (Igarashi et al. 2009). Die Argininmethylierung von STAT-Proteinen ist umstritten. 2001 wurde eine Methylierung von STAT1 an einem konservierten Arginin (Arg31) durch PRMT1 beschrieben und postuliert, dass diese Methylierung die Interaktion zwischen STAT1 mit PIAS1 verhindert (Mowen et al. 2001). Dieser Befund wurde unter anderem durch massenspektrometrische Analysen und *in vitro*-Methylierungs Assays widerlegt (Meissner et al. 2004; Komyod et al. 2005; Weber et al. 2009).

2.3.6. Regulation der PRMTs

Die Aktivität und Substratspezifität der PRMTs wird durch Interaktionen mit anderen Proteinen, posttranslationalen Modifikationen und durch die Zugänglichkeit der Substrate reguliert. Die Interaktion von PRMT1 mit BTG1, TIS2/BTG2 (*B-cell translocation gene*) und hCAF1, einem BTG1-bindendem Protein, stimuliert oder inhibiert die Aktivität von PRMT1 auf bestimmte Substrate (Lin et al. 1996; Robin-Lespinasse et al. 2007). Der Tumorsuppressor DAL-1 hemmt die enzymatische Aktivität von PRMT3 *in vitro* und in Zelllinien (Singh et al. 2004). Die Assoziation von PRMT5 mit COPR5 (*cooperator of PRMT5*) moduliert die Histonmethylierungsaktivität durch PRMT5. COPR5 interagiert dabei mit Histon H4 und begünstigt die Methylierung von H4R3 gegenüber H3R8 (Lacroix et al. 2008).

Für PRMT1, -4, -6 und -8 wurde eine Automethylierungsaktivität beschrieben, eine Funktion dieser Aktivität ist jedoch nicht bekannt (Frankel et al. 2002; Sayegh et al. 2007). Eine Phosphorylierung von PRMT4 an Serin 229 bzw. Serin 217 während der Mitose wurde von zwei Arbeitsgruppen beschrieben. Die Phosphorylierung von Serin 229 stört die Bindung des Methylgruppendonors SAM sowie die Homodimerisierung und hemmt damit die Coaktivatorfunktion der NR-abhängigen Genexpression (Higashimoto et al. 2007). Die Mutation der Aminosäure Ser 217 führt ebenfalls zum Verlust der SAM-Bindefähigkeit. Darüber hinaus bewirkt die Phosphorylierung von Ser 117 eine cytoplasmatische Lokalisation von PRMT4 (Feng et al. 2009). Die Phosphorylierung von PRMT4 stellt vermutlich einen Mechanismus dar, eine unspezifische Aktivität von PRMT4 während der Mitose zu verhindern.

PRMTs besitzen keine eigene DNA-bindende Aktivität. Die Verfügbarkeit ihrer Substrate wird daher durch Interaktion mit den Substraten oder eine spezifische Rekrutierung durch Repressorproteine oder Transkriptionsfaktoren erreicht (siehe 2.4.1.). Benachbarte posttranslationale Modifikationen können außerdem Methylierungsmotive maskieren. Zum Beispiel hemmt eine Trimethylierung von H3K4 die Dimethylierung von H3R2 durch PRMT6 und umgekehrt (Hyllus et al. 2007; Iberg et al. 2008).

2.4. Funktionen von PRMT4

2.4.1. PRMT4 als Coaktivator der Transkription

PRMT4 wurde ursprünglich in einem *Two-Hybrid*-Assay als Interaktionspartner von GRIP1, einem Mitglied der p160-Coaktivatorfamilie, identifiziert und daher ursprünglich als *Coactivator-associated Arginin-Methyltransferase 1* (CARM1) bezeichnet (Chen et al. 1999). Da CARM1 die vierte PRMT war, die entdeckt wurde, wird sie auch als PRMT4 bezeichnet (Lin et al. 1996; Scott et al. 1998; Tang et al. 1998). Es stellte sich heraus, dass PRMT4 ein transkriptioneller Coaktivator für den Androgen-, Thyroid-, und Estrogenrezeptor (AR, TR, ER) ist und diese Funktion sowohl von der Methyltransferaseaktivität als auch von der Interaktion mit p160 abhängig ist. p160-Proteine wirken als Coaktivatoren nukleärer Hormonrezeptoren (NR), indem diese an NR binden und verschiedene sekundäre Coaktivatoren rekrutieren.

Auch PRMT1 wurde wenig später als transkriptioneller Coaktivator nukleärer Rezeptoren beschrieben (Stallcup et al. 2000). Man fand heraus, dass die Methyltransferasen PRMT1 und PRMT4 bzw. die Histonacetyltransferase CBP/p300 in der transkriptionellen Aktivierung synergistisch wirken und dafür die Interaktion der Coaktivatoren mit p160 essentiell ist (Stallcup et al. 2000; Koh et al. 2001). Inzwischen ist eine Kooperativität von PRMT1 und PRMT4 in der Transkriptionsregulation neben dem NR auch für p53 und NF- κ B gezeigt (Koh et al. 2001; An et al. 2004; Hassa et al. 2008). Die Spezifität der Coaktivatorfunktion von PRMT1 bzw. PRMT4 wird durch eine direkte oder indirekte Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren vermittelt. Für p53 und die NF κ -B Untereinheit p65 wurde eine direkte Interaktion mit PRMT1 bzw. PRMT4 nachgewiesen (Covic et al. 2005). Der Coaktivator p160 ist für die transkriptionelle Regulation dieser Transkriptionsfaktoren durch PRMTs nicht notwendig. Die Ereignisse am Promotor finden während der Coaktivierung durch PRMT1, PRMT4 und CBP/p300 in einem sequentiellen Ablauf statt. Die Methylierung

von Histon H4 am R3 durch PRMT1 stellt ein frühes Ereignis der Coaktivierung dar, da die PRMT1 vermittelte Methylierung die Acetylierung durch CBP/p300 an Histon H4K8 und K12 begünstigt. Umgekehrt vermindert ein prä-acetylierter Histon H4-N-Terminus die Methylierungsaktivität von PRMT1 (Wang et al. 2001b). In Übereinstimmung damit wurde am β -Globinlokus gezeigt, dass der Verlust von PRMT1 zu einer verminderten Acetylierung an Histon H3 und Histon H4 führt. Die Rekrutierung der Histonacetyltransferasen PCAF und CBP an den β -Globinlokus wird durch die Methylierung von H4R3 begünstigt. Die Methylierung von H3R4 durch PRMT1 stellt daher eine Voraussetzung für nachfolgende Histonmodifikationen und die transkriptionelle Aktivierung dar (Li et al.; Huang et al. 2005). Für PRMT4 wurde gezeigt, dass die Acetylierung von Histon H3 am K18 und K23 durch CBP/p300 die Assoziation von PRMT4 mit Histon H3 verstärkt und dessen Methylierungsaktivität auf H3R17 begünstigt (Daujat et al. 2002). Die p53-vermittelte Expression eines GADD45-Reportergens (*growth arrest and DNA-damage inducible*) in einem zellfreien System war dann am höchsten, wenn erst PRMT1, dann CBP/p300 und zuletzt PRMT4 zugegeben wurde (An et al. 2004).

PRMT1 und PRMT4 wirken jedoch nicht nur kooperativ, sondern stellen auch individuelle Coaktivatoren dar. Es gibt etliche Transkriptionsfaktoren, für die in der Literatur bisher eine transkriptionelle Coaktivierung durch nur eine der beiden PRMTs beschrieben ist. Beispielsweise werden NF-AT, YY1 und Runx1 durch PRMT1, TCF-4, PPAR γ und E2F durch PRMT4 transkriptionell aktiviert (Bedford and Richard 2005; Bedford and Clarke 2009; Wolf 2009). Dabei wurde jedoch nicht immer eine mögliche Kooperativität untersucht.

2.4.2. PRMT4 wirkt mit Chromatinremodellern in der Transkription zusammen

Seit längerem war bekannt, dass Chromatinremodelling durch den BRG1-Komplex für die NR-vermittelte Transkription nötig ist (Fryer and Archer 1998; Hsiao et al. 2003). Anhand einer Aufreinigung von getagtem-PRMT4 wurde die Assoziation von PRMT4 mit SWI/SNF-Proteinen nachgewiesen. Innerhalb dieses Komplexes, der als NUMAC-Komplex (*nucleosomal methylation activator complex*) bezeichnet wurde, ist die Nukleosomenremodelling- und die Histonmethylierungsaktivität erhöht. Es wurde nachgewiesen, dass PRMT4 und die SWI/SNF-Komponente BRG1 direkt interagieren und an einem Zielgen des Estrogenrezeptors (ER) assemblieren, um die ER-vermittelte Transkription kooperativ zu verstärken (Xu et al. 2004). Ähnliches wurde für PRMT4 und die SWI/SNF-

Komponente SNF5 in der TR-vermittelten Genexpression festgestellt. Beide Komponenten sind für die effiziente Transkription von TR-Zielgenen notwendig. PRMT4 bzw. SNF5 sind für die Acetylierung von H3K9, einer Markierung aktiv transkribierter Gene, wichtig und bewirken einen Verlust der Methylierung von H3K9, einer heterochromatischen Modifikation (Choi et al. 2007). Ein Zusammenwirken von PRMT4 und SWI/SNF-Remodellern wurde außerdem für die Expression der späten Gene während der Muskeldifferenzierung gezeigt. PRMT4 und SWI/SNF binden in Abhängigkeit der myogenen Transkriptionsfaktoren MEF2 (*myocyte enhancer factor-2C*) und Myogenin an die Promotoren der späten Gene der Muskeldifferenzierung. Fehlt PRMT4, wird der Remodeller nicht mehr an seine Zielgene rekrutiert (Dacwag et al. 2007). In der transkriptionellen Aktivierung der frühen Gene während der Muskeldifferenzierung ist hingegen PRMT5 für die Rekrutierung von SWI/SNF wichtig (Dacwag et al. 2009).

2.4.3. PRMT4 in der Zellproliferation und Tumorgenese

PRMTs wurden mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht. Eine verstärkte Expression von PRMT4 korreliert mit aggressiven Mammakarzinomen, die erhöhte Mengen des onkogenen Coaktivators AIB1 (p160) und CyclinE1 exprimieren (El Messaoudi et al. 2006). PRMT4 wirkt zusammen mit AIB1 als transkriptioneller Aktivator in der E2F1-vermittelten Genexpression und trägt somit zur estrogeninduzierten Proliferation der Brustkrebszelllinie MCF-7 bei (El Messaoudi et al. 2006; Fietze et al. 2008). Die Expression von PRMT4 ist auch in androgenunabhängigen Prostatakarzinomen erhöht und korreliert mit der Tumorprogression (Hong et al. 2004; Majumder et al. 2006). In neuronalen PC12-Zellen führt die Methylierung von HuD zur Destabilisierung der mRNA des Zellzyklusinhibitors p21, da methyliertes HuD die p21-mRNA schlechter bindet. Während der NGF-induzierten Differenzierung der Zelllinie wird die Methylierung von HuD reduziert und p21 stabilisiert, sodass die Proliferation gehemmt wird (Fujiwara et al. 2006).

2.4.4. Die Rolle von PRMT4 in Entwicklungsprozessen

Die Analyse der PRMT4 *knock-out* Mäuse zusammen mit anderen Studien ermöglichte einen Einblick in die biologischen Funktionen von PRMT4. In der frühen T-Zellentwicklung führt der *knock-out* von PRMT4 zum Verlust von Doppelt-Negativen T-Zellen (DN) im Thymus. Da der Anteil der Zellen mit den Oberflächenmarkern CD44⁺CD25 (DN1) ansteigt und der Anteil der CD44⁺CD25⁺-Zellen (DN2) absinkt, ist die Reifung von DN1 zu DN2 blockiert. Die Autoren

brachten diesen Phänotyp mit der fehlenden Methylierung des im DN2 Stadium exprimierten Proteins TARPP (*thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein*) in Verbindung (Kim et al. 2004). Eine Transkriptomanalyse der PRMT4-*knock-out* Embryos deckte weiterhin eine Rolle von PRMT4 im Lipidmetabolismus auf. Entsprechend ist die Menge des braunen Fettgewebes in diesen Mäusen reduziert. Die Autoren zeigten, dass PRMT4 die Adipozytendifferenzierung bewirkt, indem es die PPAR γ -vermittelte Transkription adipozytenspezifischer Gene verstärkt (Yadav et al. 2008). Eine Rolle von PRMT4 in der Muskeldifferenzierung wurde erstmals 2002 beschrieben. Die Rekrutierung von PRMT4 an ein MEF2 (*myocyte enhancer factor-2C*)-reguliertes Gen wurde während der Differenzierung der myogenen Zelllinie C2C12 in multinukleäre Myotuben gezeigt (Chen et al. 2002). Auch während der embryonalen Knochenbildung spielt PRMT4 eine Rolle. PRMT4 *knock-out* Mäuse haben eine verzögerte endochondrale Ossifikation (Bildung von Knochengewebe aus Knorpel) da die Proliferation der Chondrozyten vermindert ist. Sox9 ist ein Regulator der endochondralen Ossifikation. PRMT4 methyliert SOX9 und verhindert somit die Interaktion zwischen β -Catenin und SOX9. Dies erlaubt die Expression von CyclinD1 durch β -Catenin/TCF-LEF und bewirkt die Proliferation der Chondrozyten (Ito et al. 2009). PRMT4 ist auch für die Pluripotenz in der frühen embryonalen Entwicklung wichtig. Eine Überexpression von PRMT4 in einzelnen Blastomeren des Vierzellstadiums bewirkt deren Entwicklung in pluripotente Zellen der ICM (*inner cell mass*) und die transkriptionelle Aktivierung der Gene Nanog und Sox2, die für den Erhalt der Pluripotenz entscheidend sind (Torres-Padilla et al. 2007). Eine weitere Studie zeigt, dass PRMT4 bei Selbsterneuerung und der Expression von Pluripotenzgenen in ES-Zellen eine Rolle spielt (Wu et al. 2009).

2.5. Zielsetzung

PRMT1 und PRMT4 sind Coaktivatoren etlicher Transkriptionsfaktoren. Eine Kooperativität beider PRMTs wurde für wenige Transkriptionsfaktoren untersucht und beschrieben. In unserer Arbeitsgruppe wurde mittels einer globalen Genexpressionsanalyse eine Kooperativität von PRMT1 und PRMT4 anstatt einer individuellen Funktion in der Genregulation aufgedeckt (Dissertation Markus Kleinschmidt, 2006). Ziel der vorgelegten Arbeit war es, die transkriptionelle Regulation der durch PRMT1 und PRMT4 kooperativ aktivierten Gene CITED2 und KRT8 genauer zu charakterisieren. Da in den Promotorregionen dieser Gene Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren STAT5 und STAT6 identifiziert wurden, sollte deren transkriptionelle Induzierbarkeit durch einen Cytokinstimulus überprüft werden. Mittels RNAi (*RNA interference*) sollte dann untersucht werden, ob die cytokinininduzierte Transkription der beiden Gene von den Transkriptionsfaktoren STAT5 und STAT6 oder von den Coaktivatoren PRMT1 und PRMT4 abhängig ist. Anschließend sollte der Mechanismus der transkriptionellen Aktivierung durch PRMT1 und PRMT4 analysiert werden. Anhand von Chromatinimmunpräzipitationen (ChIP) sollte überprüft werden, ob PRMT1 und PRMT4 ihre putativen Zielgene durch eine direkte Promotorbindung regulieren und ob diese Regulation mit der Methylierung von Histonen einhergeht. Interaktionsstudien sollten außerdem Aufschluss darüber geben, ob die Zielgenspezifität von PRMT1 und PRMT4 durch eine cytokinininduzierte Interaktion mit STAT5 vermittelt wird.

Es ist bekannt, dass PRMT4 seine Funktion als Coaktivator durch die Interaktion mit anderen Proteinen oder sogar innerhalb von Komplexen ausübt. Die Identifikation neuer Interaktionspartner von PRMT4, sollte zur Aufdeckung bisher unbekannter Funktionen von PRMT4 führen. Dafür sollten im zweiten Teil dieser Arbeit potentielle PRMT4-Komplexe mittels chromatographischer Methoden angereichert und mit einer anschließenden Immunaффinitätsaufreinigung isoliert werden. Die aufgereinigten Proteine sollten mittels MALDI-TOF analysiert werden. Dabei wurde Mi-2 α als potentieller Interaktionspartner von PRMT4 identifiziert. Da Mi-2 α und Mi-2 β Proteine mit hoher Sequenzidentität sind, sollte die Interaktion beider Proteine mit PRMT4 in unabhängigen Interaktions-Assays validiert werden. Da Mi-2 als integraler Bestandteil des NuRD-Komplexes beschrieben ist, sollte eine Assoziation von PRMT4 mit NuRD-Untereinheiten überprüft werden. Es ergab sich die Frage nach einem funktionellen Zusammenhang zwischen PRMT4 und den beiden Chromatinremodellern. Da Mi-2 α aus der Literatur als transkriptioneller Aktivator der c-

Myb-vermittelten Genexpression bekannt war, sollte zunächst eine mögliche Interaktion von PRMT4 und c-Myb überprüft werden. Anschließend sollte die transkriptionelle Coregulation bekannter c-Myb-Zielgene durch PRMT4 und Mi-2 mit Cotransfektions-Assays in der Hühnchen-Makrophagenzelllinie HD11 und durch Depletion von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 α bzw. Mi-2 β mittels RNAi in der humanen leukämischen Zelllinie K562 untersucht werden. Durch ChIP-Analysen sollte überprüft werden, ob die c-Myb-Zielgene direkt durch PRMT4 und Mi-2 reguliert werden. Die biologische Relevanz von PRMT4 und Mi-2 sollte in K562-Zellen anhand von Proliferations- und Zellzyklusanalysen sowie mit Differenzierungs-Assays untersucht und mit den c-Myb-vermittelten biologischen Effekten verglichen werden.

3. Material

3.1. Bakterienstämme

Escherichia coli (*E. coli*) DH5a zur Präparation von Plasmiden

E. coli BL21 DE3 zur Präparation von Fusionsproteinen

3.2. Bakterienmedien und Zusätze

LB-Medium

LB-Agar

Ampicillin; Sigma

Kanamycin

3.3. Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
HD11	Hühnchen-Makrophagenzelllinie, transformiert durch MC29 (Beug et al. 1979)
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert durch Adenovirus 5
HeLa	Zelllinie aus humanem Zervixkarzinom
HL-60	Humane promyelocytische Leukämiezelllinie, isoliert aus dem peripherem Blut einer 35-jährigen Frau mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) (Collins et al. 1977)
Jurkat	Humane T-Zell-Leukämiezelllinie, isoliert aus dem peripherem Blut eines 14-jährigen Jungen mit Akuter Lymphoblastischer Leukämie (ALL), (Schneider and Schwenk 1977)
K562	Humane erythroleukämische Zelllinie, Isolat aus einer 53-jährigen Frau mit Chronischer Myeloischer Leukämie (CML) in der terminalen Blastenkrise, (Lozzio and Lozzio 1975)
MCF-7	Human Brustadenokarzinomzelllinie
Molt-4	Humane T-Zell-Leukämiezelllinie, isoliert aus peripherem Blut eines 19-jährigen Mannes mit Akuter Lymphoblastischer Leukämie (ALL), (Minowada et al. 1972)
QT-6	Wachtel-Fibroblastenzelllinie, gewonnen aus Methylcholantren induziertem Fibrosarkom

3.4. Zellkulturmaterialien

Zellkulturflaschen und Schalen; Greiner

Elektroporations-Küvetten; PeqLab

Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) mit 2 mM L-Glutamin und Phenolrot;

Lonza

RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamine; PAA

Basal Iscove`s Medium; Biochrom AG

Fetales Kälberserum (FBS); Invitrogen

Hühner Serum; Sigma

1 x Trypsin/EDTA; Lonza (Lonza)

Penicillin/Streptomycin; Lonza

Opti-MEM I; Invitrogen

DMSO; Applichem

Methylcellulose Methocult M3234; Stem Cell Biotechnologies

Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT); Sigma

Cytosinarabinosid (Ara-C); bereitgestellt von der zentralen Zytostatika Zubereitung
des Klinikums Marburg; Merck

Hemin; Sigma

4-Hydroxytamoxifen

Trypanblau; Sigma

3.5. Cytokine

rekombinantes IL-4; Strathmann

3.6. Transfektionsreagenzien

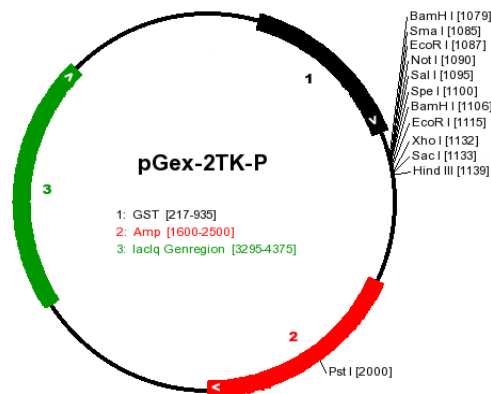
Fugene HD; Roche

Oligofectamine; Invitrogen

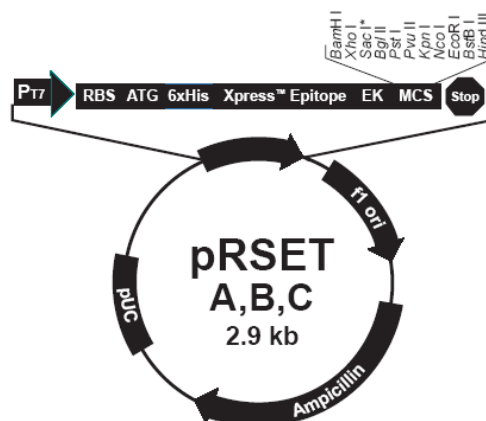
3.7. Plasmide

3.7.1. Expressionsplasmide für Bakterien

pGEX 2TK-P: Leervektor zur Generierung von Fusionsproteinen mit N-terminalem Glutathione-S-Transferase-Tags zur bakteriellen Expression. Enthält eine Ampicillin-Resistenz. Größe 5 kbp.



pRSET-RRR: Leervektor zur Generierung von Fusionsproteinen mit N-terminalem 6xHis-Tag zur bakteriellen Expression. Drei Arginine (R) in der MCS (multiple-cloning-site) in der sind zu Alaninen mutiert worden. Enthält eine Ampicillin-Resistenz. Größe 2,9 kbp



pGex-4T1-hPRMT1: Enthält den ORF des humanen PRMT1 in pGex-4T-1. Die Klonierung erfolgte über BamHI und NsiI. Größe 6 kbp. (Scott et al., 1998.)

pGEX-4T1-PRMT4: Enthält den ORF des murinen PRMT4 und zusätzlich 1400 bp 3'-UTR, das Fragment (3200 bp) wurde über EcoRI in pGex-4T-1 kloniert. Erstbeschreibung in (Chen et al. 1999).

pGex-2.1-hPRMT6: Die cDNA des humanen PRMT6 wurde aus MCF7 Zellen amplifiziert, wobei der Vorwärtsprimer eine BamHI Schnittstelle generierte (3,3) und der Rückwärtsprimer eine EcoRI Schnittstelle generierte (3,3). Über diese Schnittstellen wurde die PRMT6 cDNA (1125 bp) in pGex-2.1 kloniert (Hyllus et al., 2007).

pRSET-RRR-c-Myb: Enthält den ORF des humanen c-Myb (AS 1 - 636) aus pCI-neoB-hc-Myb-HA (Saether et al. 2007). Der Ursprungsvektor wurde 3' des ORF von c-Myb mit Sall geschnitten und der 5'-Überhang mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Der Vektor pRSET-RRR C wurde mit EcoRI geschnitten und ebenfalls mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Leervektor und Ursprungsvektor wurden in einem zweiten Verdauungsschritt mit XhoI verdaut. Das aufgereinigte Fragment (2000 bp) wurde 5'-blunt/3' XhoI in den Leervektor kloniert (Diese Arbeit).

pRSET-RRR-Mi-2 α _Nt: Der N-Terminus (AS 1 - 377) des hMi-2 α wurde ausgehend von pCIneoB-Flag-Mi-2 α mit Klonierungs-Primern so amplifiziert, dass 5' eine BamHI und 3' ein Stopcodon und eine Bsp119I Schnittstelle angefügt wurde. Die Klonierung des Fragmentes erfolgte über BamHI und Bsp119I in den Leervektor pRSET-RRR A (Diplomarbeit Marc Zeller).

pRSET-RRR-Mi-2 α -PHD: Das Tandem-PHD-Finger umspannende Fragment (AS 369 - 517) des hMi-2 α wurde ausgehend von pCIneoB-Flag-Mi-2 α mit Klonierungs-Primern so amplifiziert, dass 5' eine BamHI und 3' ein Stopcodon und eine Bsp119I Schnittstelle angefügt wurde. Die Klonierung des Fragmentes erfolgte über BamHI und Bsp119I in den Leervektor pRSET-RRR A (Diplomarbeit Marc Zeller).

pRSET-RRR-Mi-2 α -Chr: Das Tandem-Chromodomäne umspannende Fragment (AS 484 - 686) des hMi-2 α wurde ausgehend von pCIneoB-Flag-Mi-2 α mit Klonierungs-Primern so amplifiziert, dass 5' eine BamHI und 3' ein Stopcodon und eine Bsp119I Schnittstelle angefügt wurde. Die Klonierung des Fragmentes erfolgte über BamHI und Bsp119I in den Leervektor pRSET-RRR A (Diplomarbeit Marc Zeller).

pRSET-RRR-Mi-2 α -H: Die Helikasedomäne (AS 678 - 1245) des hMi-2 α wurde ausgehend von pCIneoB-Flag-Mi-2 α mit Klonierungs-Primern so amplifiziert, dass 5' eine BamHI und 3' ein Stopcodon und eine Bsp119I Schnittstelle angefügt wurde. Die Klonierung des Fragmentes erfolgte über BamHI und Bsp119I in den Leervektor pRSET-RRR A (Diplomarbeit Marc Zeller).

pRSET-RRR-hMi-2 α _Ct: Der C-Terminus (AS 1240 - 2000, 89 kDa) des hMi-2 α , Isoform1, wurde mit den Klonierungsprimern 607 und 617 ausgehend von pCIneoB-Flag-Mi-2 α

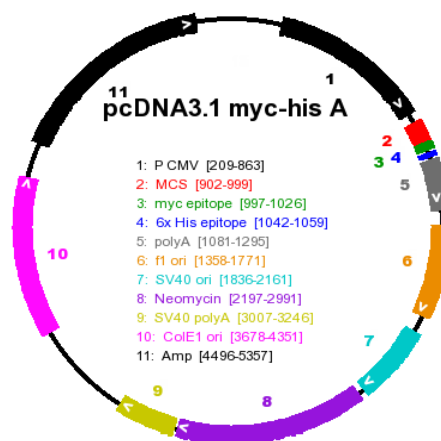
amplifiziert. Die Klonierung des Fragmentes erfolgte über BamHI und Bsp119I in den Leervektor pRSET-RRR A (Diplomarbeit Marc Zeller).

3.7.2. Expressionsplasmide für eukaryotische Zellen

pcDNA3 GFP: Enthält cDNA für GFP. Leervektor zur Generierung von N-Terminalen GFP-Fusionen. Dient zur Kontrolle der Transfektionseffizienz. Enthält einen CMV-Promotor. Trägt Ampicillin und Neomycin Resistenz. Größe 5,8 kbp.

pcDNA3 HA: Leervektor zur Generierung von Fusionsproteinen mit N-terminalem Hämagglutinin-Tag (HA) zur Expression in Eukaryoten. Enthält einen CMV-Promotor. Trägt Ampicillin und Neomycin Resistenz. Größe 5,5 kbp. (Invitrogen, T. Kouzarides)

pcDNA3.1 Myc/His: Leervektor zur Generierung von Fusionsproteinen mit N-terminalem Myc/6xHis-Tag zur Expression in Eukaryoten. Enthält CMV-Promotor. Trägt Ampicillin und Neomycin Resistenz. Größe 5,5 kbp.



pcDNA3.1 hPRMT1-Myc/His: Das Plasmid enthält ORF des humanen PRMT1 fusioniert mit einem C-terminalen Myc/His-Tag. Klonierung erfolgte über BamHI und EcoRI (5,5 kbp und 1080 bp Insert). Enthält einen CMV-Promotor zur eukaryotischen Expression (Balint et al. 2005).

pcDNA3.1 hPRMT6-Myc/His: Enthält den ORF des humanen PRMT6 fusioniert mit einem C-terminalen Myc/His-Tag. Enthält einen CMV-Promotor zur eukaryotischen Expression.

pcDNA3.1 mPRMT4: Enthält den ORF des murinen PRMT4 (1827 bp) und zusätzlich eine 1400 bp lange 3'-UTR ohne Tag. Die Klonierung erfolgte über EcoRI Verdau des Ursprungsplasmides pSG5 HA-PRMT4 und des Vektors pcDNA3.1. Die richtige Orientierung

des Fragmentes (3200 bp) wurde mit NotI/Kpn2I-Verdau (Fragmente 2200 bp) überprüft. Das Konstrukt wird ohne Tag exprimiert. Enthält einen CMV-Promotor zur eukaryotischen Expression.

pCI-neoB hc-Myb-HA: Enthält die cDNA für humanes c-Myb (AS 1 - 640) mit C-Terminalem HA-Tag zur Expression in Eukaryoten. 5' vom ORF des c-Myb befindet sich eine XhoI-Schnittstelle, 3' des HA-Tags eine Sall-Schnittstelle. Der Tag wird von α -HA von Sigma (H6908) erkannt. Enthält einen CMV-Promotor zur eukaryotischen Expression und einen T7-Promotor (Dahle et al. 2003).

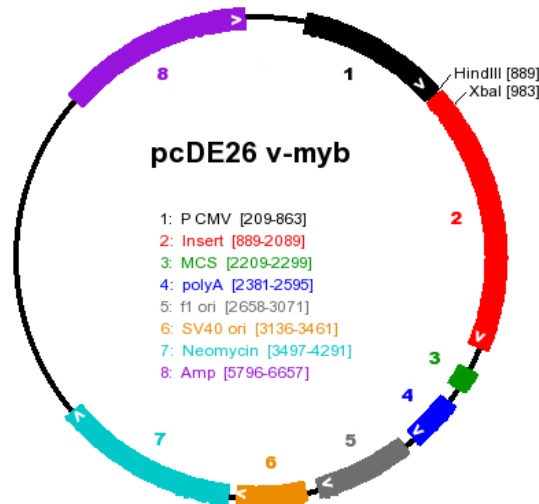
pCI Flag-Alix: Enthält die cDNA für humanes Alix (AS 1 - 868). Enthält einen CMV-Promotor zur eukaryotischen Expression und einen T7-Promotor. (von Rob Fisher, Utah)

pCI Flag-Alix Δ C: Enthält die cDNA für humanes Alix mit einer C-terminalen Deletion (AS 1 - 830). Enthält einen CMV-Promotor zur eukaryotischen Expression und einen T7-Promotor (von Rob Fisher, Utah).

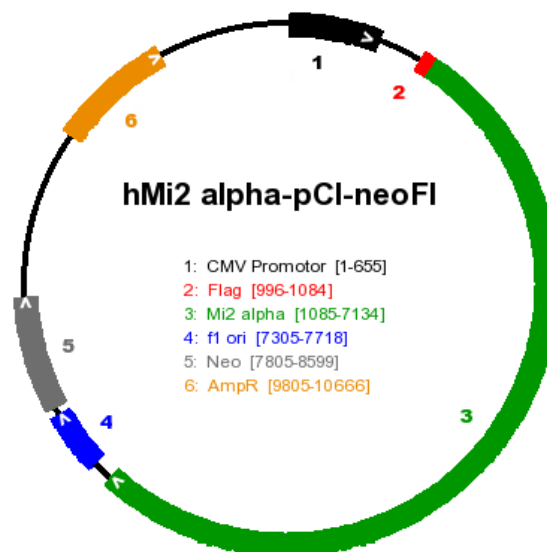
pcDNA3 hc-Myb-HA: Enthält die cDNA für humanes c-Myb (AS 1 - 640) fusioniert mit einem C-terminalen HA-Tag. Enthält einen CMV-Promotor zur eukaryotischen Expression und einen T7-Promotor. Größe 6,4 kbp.

pcDNA3.1 m-c-Myb-Flag: Enthält die cDNA für murines c-Myb (AS 1 - 636) fusioniert mit einem N-Terminalen Flag-Tag. Die Klonierung erfolgte über BamHI und XbaI. Das Plasmid enthält einen CMV-Promotor zur eukaryotischen Expression. Größe 5,7 kbp (Bies et al. 1999).

pcDE26 v-Myb: Enthält die cDNA des viralen Myb E26. Die Klonierung des 1200 bp großen Fragmentes erfolgte HindIII/XbaI. Trägt eine Ampicillin und Neomycin-Resistenz. Größe 6,7 kbp.

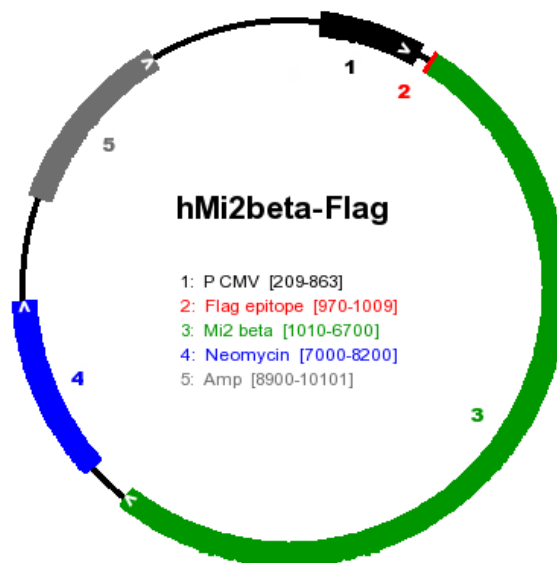


pCIneoB Flag-Mi-2 α : Expression des humanen Mi-2 α (AS 1 - 2000), Isoform1, als Fusion mit N-terminalem Flag-Tag. Enthält einen CMV-Promotor zur eukaryotischen Expression und einen T7-Promotor (Saether et al. 2007).



pCIneoB Flag-Mi-2 α K767A: Helikase inaktive Mutante des hMi-2 α , da Lysin 767 zu Alanin mutiert wurde (Saether et al. 2007).

pcDNA3 Flag-Mi-2β: Expression des humanen Mi-2β (AS 1 - 1912, 218 kDa. Konstrukt enthält einen N-Terminalen 6 x His-Tag und einen C-terminalen Flag-Tag (Feng and Zhang 2001).

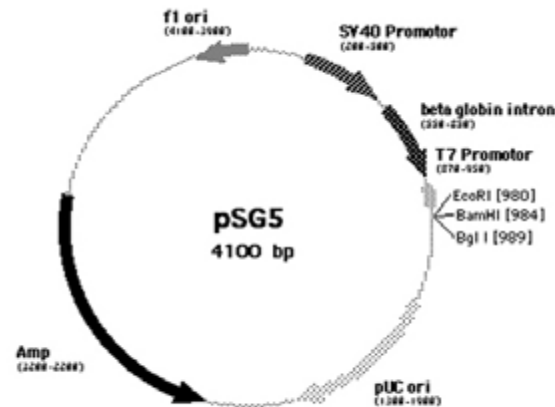


pcDNA3 HA-Mi-2β: Enthält eine C-terminal trunkierte Form des Mi-2β (1 - 1619 statt 1912 AS) und ist N-terminal mit einem HA-Tag fusioniert.

pCDN3-CCR: Enthält die cDNA des Hühnchen C/EBPβ (CCR) ohne Tag. Enthält einen CMV-Promotor zur eukaryotischen Expression. (Schwartz et. al. 2003)

pECE-STAT5A: Enthält den ORF des humanen STAT5B. Enthält einen CMV-Promotor zur eukaryotischen Expression. Trägt Ampicillin Resistenz. (Behrmann, Aachen)

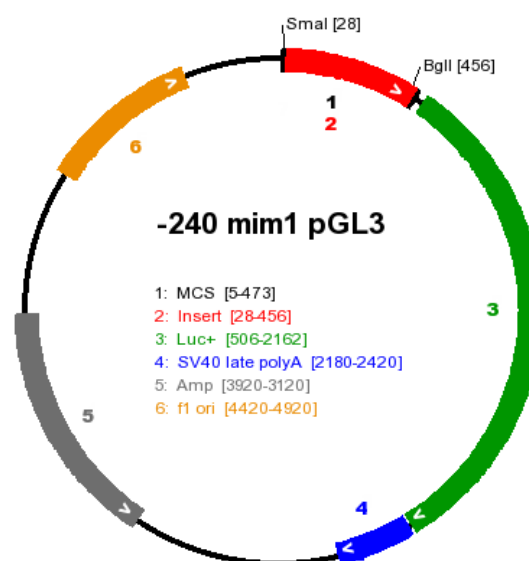
pSG5 HA: Leervektor zur Generierung von Fusionsproteinen mit N-terminalem HA-Tag. Enthält SV40 Promotor zur eukaryotischen Expression und T7-Promotor. Trägt Ampicillin Resistenz. 4,1 kbp



pSG5 HA-mPRMT4: Enthält den ORF des murinen PRMT4 (1827 bp) und zusätzlich 1400 bp 3'-UTR. Das Fragment (3200 bp) wurde über EcoRI in den pSG5 kloniert. Größe 7,5 kbp (Chen et al. 1999).

pSG5 HA-PRMT4VLD: Katalytisch inaktive Variante von mPRMT4 durch Mutation der S-Adenosyl-Methionin-Bindestelle. Die Aminosäuren Valin (189), Leucin (190) und Aspartat (191) des mPRMT4 wurden zu Alaninen mutiert (Chen et al. 1999).

pGL3 240-Luc: Die mim-1-Promotorsequenz von -240 bis +150 bp wurde als XmaI/BamHI-Fragment in den das Luciferase-Reportergen enthaltenden Vektor pGL3 kloniert. Größe 5,3 kbp (Ness et al. 1989).



pGL3tk81 1-400mim1: Der Enhancer des mim-1-Gens (ca. 400 bp) wurde durch anfügen von KpnI/KpnI-Schnittstellen mittels PCR stromaufwärts des Thymidine-Kinase Promotors des Herpes Simplex-Virus in den Vektor pGL3tk-81 kloniert. (Chayka et al. 2005)

pGL3 mim3mim-240: Enthält Promotorsequenz des mim-1 Promotors von -240 bis +150 bp, die über XmaI und BglII in den Leervektor pGL3-Basic inseriert wurde. Zusätzlich wurde stromaufwärts vom mim-1-Promotor eine mim-1-Enhancersequenz (ca. 795bp) einkloniert. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenz. (Chayka et al. 2005)

pGL2b-TRHR-1250: Enthält die Promotorregion -1250 bis +1 des *Thyrotropin-releasing-Hormon*-Rezeptor TRHR in Fusion mit einem Luciferasegen. (Matre et al. 2003)

CMV-βGal: Enthält den ORF der β-Galaktosidase unter Kontrolle eines CMV-Promotors zur eukaryotischen Expression.

3.8. Antikörper

3.8.1. Erstantikörper für Western Blot

Antikörper	Firma/Herkunft	Spezies	Verdünnung in WB
c-myc (9E10)	AG Eilers	Maus, monoklonal	1:1000
Flag (F 3165)	Sigma	Maus, monoklonal	1:2500
HA (12CA5)	Roche	Maus monoklonal	1:500 - 1:1000
HA.11 (MMS-101P)	Covance	Maus monoklonal	1:500 - 1:1000
HDAC1		Kaninchen polyklonal	1:1000
MBD3 (sc 9402)	Santa Cruz	Ziege, polyklonal	1:1000
Mi-2 (H-242)	Santa Cruz	Kaninchen, polyklonal	1:500 – 1:1000
Myb, clone1_1	Upstate	Maus, monoklonal	1:500 - 1:1000
Phospho-Stat5	cell signalling (NEB)	Kaninchen, polyklonal	1:500, 1:750
Phospho-STAT5 (Y699)	R u D systems	Kaninchen IgG	1:700 - 1:1000
PhosphoSTAT6 (TYR641)	cell signalling (NEB)	Kaninchen, polyklonal	1:1000 in BSA
PRMT1	AG Bauer	Kaninchen, Serum	1:5000
PRMT1	AG Bauer	Kaninchen, affinit. aufg.	1:500 - 1:1000
PRMT1 (07-404)	Upstate	Kaninchen, polyklonal	1:1000
PRMT4	AG Bauer	Kaninchen, Serum	1:10000 -1:20000
PRMT4	AG Bauer	Kaninchen, affinit.aufg.	1:500 - 1:2000
β-Tubulin	Chemicon	Maus monoklonal	1:10000

Antikörper	Firma/Herkunft	Spezies	Verdünnung in WB
STAT 5 (C-17)	Santa Cruz	Kaninchen, polyklonal	1:1000
STAT6 (M-20)	Santa Cruz	Kaninchen, polyklonal	1:500

3.8.2. Zweitantikörper für Western Blot

Zweitantikörper (HRP gekoppelt)	Firma/Herkunft	Spezies	Verdünnung in WB
Kaninchen (NA934)	GE Healthcare	Esel	1:5000
Maus (NXA931)	GE Healthcare	Schaf	1:5000
Ziege (sc-2020)	Santa Cruz	Esel	1:10000

3.8.3. Antikörper für Immunpräzipitation und Chromatinimmunpräzipitation

Antikörper	Firma/Herkunft	Spezies	µg in IP/mg Protein	µg in CHIP
Flag (F 3165)	Sigma	Maus, monoklonal	1 µg	
H3R17dimethyl	U. Bauer	Kaninchen, polyklonal		5 µl
H4R3dimethyl	Upstate	Kaninchen, polyklonal		8 µl
HA.11 (MMS-101P)	Covance	Maus monoklonal	1 µg	
IgG Kaninchen	Sigma	Kaninchen		4 µg
IgG Kaninchen	PIERCE	Kaninchen		
IgG Maus	SIGMA	Maus		
c-Myb, clone1_1	Upstate	Maus, monoklonal	1 µg	4 µg
PRMT1	AG Bauer	Kaninchen, Serum	10-15 µl	30 µl
PRMT1	AG Bauer	Kaninchen, affinit. aufg.	15 – 30 µl	60 µl
PRMT1 (07-404)	Upstate	Kaninchen, polyklonal		
PRMT4	AG Bauer	Kaninchen, Serum		10 µl
PRMT4	AG Bauer	Kaninchen, affinit.aufg.	10-15 µl	30 µl
PRMT4 (M-16)	Santa Cruz	Ziege, polyklonal	2 µg	
STAT 5 (C-17)	Santa Cruz	Kaninchen, polyklonal		4 µg

3.9. Oligonukleotide

3.9.1. Sequenzierprimer

Gen	Position	Sequenz	Tm
h Mi-2 β _808_F CCDS8552.1	790 - 807	GAG GGC AAA GGT CCC AAT	56°C
h Mi-2 β _1806_F CCDS8552.1	1786 - 1805	CGA AAG CGA AAG AAC AAG GA	55,3°C
h Mi-2 β _2810_F CCDS8552.1	2790 - 2809	TTT GGA GGA GTT TGC TGA CA	55,3°C
h Mi-2 β _3828_F CCDS8552.1	3808 - 3827	TTG CAG GGC ATG AAT GAA TA	53,2°C
h Mi-2 β _4820_F CCDS8552.1	4800 - 4819	TGC CTC AGA GGA TGA AAA GG	57,3°C
h Mi-2 β _5322_F CCDS8552.1	5302 - 5321	GAA ATG AAC CGT GGC AAT TT	53,2°C
h Mi-2 β _641_R CCDS8552.1	642 - 661	TGC CTT TGA AGG GGT TAT TG	55,3°C
h c-Myb-Seq1_Rev CCDS47481.1	632 - 652	TGT TCT TCT GGA AGC TTG TGG	57,9°C
h c-Myb-Seq2 CCDS47481.1	417 - 440	TCC AGA AGT TAA GAA AAC CTC CTG	59,3°C
h c-Myb-Seq3 CCDS47481.1	1642 - 1659	CAC AAA TTG ACT GTT ACA	58,1°C

3.9.2. Primer für quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Primer	Position	Sequenz	Tm
ch C/EBP β NM_205253.1	827 - 886 (60 bp)	Fwd: TCC TAC CTG GGC TAC CAG TC Rev: GGA CGA GGT GGA CAG GTT C	60°C
ch GAPDH NM_204305.1	623 - 695 (73 bp)	Fwd: CCT CTG GGA AGC TGT GGA Rev: TTA GCA GCC CCA GTG GAC	58°C
ch Lyz NM_205281.1	233 - 319 (87 bp)	Fwd: CCG ACT GAA TCC TAC AGA Rev: ACG GGA TGT TGC ACA GGT	59,8°C 56°C
ch mim-1 NM_205478.1	210 - 320 (111 bp) (NI)	Fwd: GGT AAA GGA GAA AAG CAC AAG G CAC Rev: CAG AAA AGG GAG CAT ACA	60,3°C 57,9°C
h Ada NM_000022.2	456 - 515 (60 bp)	Fwd: TCC AAA GTG GAG CCA ATC C Rev: CAC CTC GTC TGG GGT GAG	60°C

Primer	Position	Sequenz	Tm
h CCNB1 NM_031966.2	1182 - 1283 (102 bp)	Fwd: CATGGT GCA CTT TCC TCC TT Rev: AGG TAA TGT TGT AGA GTT GGT GTCC	60°C
h CDC7 NM_001134420.1	1316 - 1393 (78 bp)	Fwd: TGC TAT GCA ACA GAT AAA GTT TGT AG Rev: TCC TGG TGT ACC TGC CCT A	60°C
h CITED2 NM_006079.3	1639 - 1713 (75 bp) (NI)	Fwd: TCA CTT TCA AGT TGG CTG TCC Rev: CAT TCC ACA CCC TAT TAT CAT CTG T	60°C
h c-MYB NM_005375.2	1766 - 1878 (113 bp)	Fwd: CTG AAG AAA ATC AAA CAA GAG GTG Rev: GAG GTC TGC GTG AAC AGT TG	57,6°C 59,4°C
h c-MYC NM_002467.4	1311 - 1412 (102 bp)	Fwd: CAC CAG CAG CGA CTC TGA Rev: GAT CCA GAC TCT GAC CTT TTG C	60°C
h GAPDH NM_002046	83 - 148 (66 bp)	Fwd: AGC CAC ATC GCT CAG ACA C Rev: G CCC AAT ACG ACC AAA TCC	60°C
h GATA3 NM_001002295.1	1458 - 1524 (66 bp)	Fwd: CTC ATT AAG CCC AAG CGA AG Rev: TCT GAC AGT TCG CAC AGG AC	60°C
h HBG1A NM_000559.2	349 - 469 (121 bp)	Fwd: TGG ATC CTG AGA ACT TCA AGC Rev: GCC ACT GCA GTC ACC ATC T	60°C
h KRT8 NM_002273.3	674 - 769 (96 bp)	Fwd: AAC GAA TTT GTC CTC ATC AAG AA Rev: GTT GAT CTC GTC GGT CAG C	58 °C
h MAT2A NM_005911.4	502 - 600 (99 bp)	Fwd: GAA GAA GAC ATT GGT GCT GGA Rev: CTT GTG TGC CAA GAC AAT GG	60°C
h Mi-2 α NM_001005273.2	4484 - 4579 (95 bp)	Fwd: GGG GCA AGA CTG AGA AGG A Rev: CAT CGG CAA AGG TTT CAG AG	60°C
h Mi-2 β NM_001273.2	5057 - 5125 (68 bp)	Fwd: GGA GAC AGA GCC CAA AGG T Rev: GGG GTC AGA TCT ATT GCT GAC TT	60°C
h NMU NM_006681.1	298 - 370 (73 bp)	Fwd: TTT CTG TCC ATT GAT TCT CAG C Rev: GCA TTC CCA TAA TCA TAA AGC AA	60°C
h PRMT1 NM_001536	32 – 104 (72 bp)	Fwd: GAG AAT TTT GTA GCC ACC TTG G Rev: CCT GGC CAC AGG ACA CTT	60°C
h PRMT4 NM_199141	538 - 602 (64 bp)	Fwd: CAC ACC GAC TTC AAG GAC AA Rev: AAA AAC GAC AGG ATC CCA GA	60°C
v-Myb_E26 NM_205306, ch. Myb	1270 - 1337 (68 bp)	Fwd: GTT TCC TGT TTG GGG GAA C Rev: TCA GGT AAG CAA CCA TGA TCC	59°C

3.9.3. Primer für ChIP-Analysen

Gen	Position	Sequenz	Tm
h CCNB1-ChIP100up Myb-Bindestelle (Nakata et al. 2007)	-118 - (+85) (203 bp)	Fwd: ATC GCC CTG GAA ACG CAT TCT CT Rev: AGA AGC AGA ACA CCG GAG GC	62,4°C 61,4°C
h CDC7-ChIP600up Myb-Bindestelle	-595 - (-510) (85 bp)	Fwd: CCG TTA TTG TCA TCG CTT CA Rev: TTT TCT AGG GGC TGG AAT CA	55,3°C 55,3°C
h CITED2 STAT5-Bindestelle	-1324 - (-1054) (270 bp)	Fwd: GCC CAG ACC TGT GTT AGG GGT TT Rev: TGA GTA AGG CTG CTC TTG CTG GA	60°C
h CITED2 Kontrollprimer	- 6835 - (-6493) (342 bp)	Fwd: CTC AGA AGA GCC CAG TGT AGCA Rev: GGATGA GGT ATG TTG GAA AGC AGA	60°C
h c-MYC-ChIP600up Myb-Bindestelle (Berge et al. 2007)	-667 - (531) (136 bp)	Fwd: AAA AGG GGA AAGAGG ACC TGG Rev: CCT AAA AGG GGC AAG TGG AGA G	59,8°C 62,1°C
h β -Tubulin-ProChIP Kontrollprimer	-448 - (-152) 296 bp	Fwd: TGT CTT CCC CAC CAC CCA ACT Rev: CAA AGC CTC ATC GAG CCT GGC	61 °C

Alle Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) synthetisiert.

3.9.4. siRNA

siRNA	Gen	Position in cDNA	Sequenz	Referenz
siNON	-	-	Sense: UUG AUG UGU UUA GUC GCU A Antisense: UAG CGA CUA AAC ACA UCA A	Dharmacon
siLuc_2	-	-	Sense: GAU UAU GUC CGG UUA UGU Antisense: UAC AUA ACC GGA CAU AAU C	Dharmacon
siscr_3	-	-	Sense: UAG CGA CUA AAC ACA UCA A Antisense: UUG AUG UGU UUA GUC GCU A	Dharmacon
siPRMT1_2	PRMT1 NM_001536.3	722 - 740	Sense: UCA AAG AUG UGG CCA UUA A Antisense: UUA AUG GCC ACA UCU UUG A	Dharmacon

siRNA	Gen	Position in cDNA	Sequenz	Referenz
siPRMT4_1	PRMT4 NM_199141.1	609 - 627	Sense: CAU GAU GCA GGA CUA CGU G Antisense: CAC GUA GUC CUG CAU CAU G	(Kleinschmidt et al. 2008)
siPRMT4_2	PRMT4 NM_199141.1	1433 - 1451	Sense: GGA CAU GUC UGC UUA UUG C Antisense: GCA AUA AGC AGA CAU GUC C	Dharmacon
siPRMT4_3	PRMT4 NM_199141.1	111 - 129	Sense: UGG AGC CGG AUC UAA GAU G Antisense: CAU CTT AGA TCC GGC TCC A	(Kleinschmidt et al. 2008)
siMi-2 α _1	Mi-2 α NM_001005273.2	2732 - 2750	Sense: CGU AUG AGC UGA UCA CCA U Antisense: AUG GUG AUC AGC UCA UAC G	Dharmacon
siMi-2 α _2	Mi-2 α NM_001005273.2	2002 - 2020	Sense: GAG GAG AAG UAC UAU CGU U Antisense: AAC GAU AGU ACU UCU CCU C	Dharmacon
siMi-2 β _1	Mi-2 β NM_001273.2	5203 - 5221	Sense: CCA AGG ACC UGA AUG AUG A Antisense: UCA UCA UUC AGG UCC UUG G	Dharmacon
siMi-2 β _2	Mi-2 β NM_001273.2	5069 - 5087	Sense: CAA AGG UGC UGC UGA UGU A Antisense: UAC ATC AGC AGC ACC TTT G	Dharmacon
sic-Myb_1	c-Myb NM_001130173.1	533 - 551	Sense: CCG AAA CGU UGG UCU GUU A Antisense: UAA CAG ACC AAC GUU UCG G	Dharmacon
sic-Myb_2	c-Myb NM_001130173.1	1857 - 1875	Sense: CAA CAC CAU UUC AUA GAG A Antisense: UCU CUA UGA AAU GGU GUU G	Dharmacon

siRNA	Gen	Position in cDNA	Sequenz	Referenz
sic-Myb_3	c-Myb NM_001130173.1	922 - 940	Sense: CAA CGA CUA UUC CUA UUA C Antisense: GUA AUA GGA AUA GUC GUU G	Dharmacon
sic_Myb_4	c-Myb NM_001130173.1	523 - 541	Sense: GAA AUA CGG UCC GAA ACG U Antisense: CUU UAU GCC AGG CUU UGC A	Dharmacon
siSTAT5	STAT5 NM_003152.3 NM_012448.3	1368 - 1386 895 - 913	Sense: GCA GCA GAC CAU CAU CCU G Antisense: CAG GAU GAU GGU CUG CUG C	Eurogentec
siSTAT6	STAT6 NM_003153.3	1621 - 1639	Sense: GAU GUG UGA AAC UCU GAA C Antisense: GUU CAG AGU UUC ACA CAU C	Eurogentec

SiRNA wurde von Eurogentec (Belgien) der Dharmacon (Thermo Scientific, USA) bezogen. Die verwendeten siRNAs bewirkten die Depletion aller bekannten humanen Isoformen des jeweiligen Proteins.

3.10. Enzyme

Benzonase Nuclease 250 U/μl; (Novagen)

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) 10 U/μl; (Fermentas)

DNA Restriktionsendonucleasen wurden von Fermentas oder New England Biolabs bezogen

Klenow-Fragment; Fermentas

M-MLV-Reverse Transkriptase, 200 U / μl; (Invitrogen)

Proteinase K 20 μg/μl; (Applichem)

Ribonuklease A (DNase frei) 10 μg/μl; (Applichem)

T4-DNA-Ligase 30 U/μl; (Fermentas)

3.11. Inhibitoren

Aprotinin (Serin-Proteaseinhibitor); Applichem

Leupeptin (Serin-Protease- und Cystein-Proteaseinhibitor); Applichem

PMSF (Serin-Proteaseinhibitor); Sigma-Aldrich

Proteaseinhibitor-Cocktail-Tabletten (*complete, Mini, EDTA free*); Roche

Phosphataseinhibitor NaF (Serin/Threoinin-Phosphataseinhibitor); Applichem

Phosphataseinhibitor Na₃VO₄ (Tyrosin-Phosphataseinhibitor); Sigma-Aldrich

RiboLock Ribonukleaseinhibitor (40 U/μl); Fermentas

3.12. Radioaktive Substanzen

L-[³⁵S]-Methionin; GE Healthcare

S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C] Methionin; GE Healthcare

3.13. Standards

Proteinstandards:

PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Fermentas

PageRuler™ Unstained Protein Ladder; Fermentas

DNA-Standard:

GeneRuler™ DNA Ladder Mix; Fermentas

3.14. Chromatographiematerialien

EMD DEAE Fractogel 650 (S); Merck

MonoQ (Fertigsäule), GE Healthcare

MonoQ (); GE Healthcare

Phosphocellulose P11; Whatman

Superose6, HR10/30; GE Healthcare

Superdex 200 HR 10/30; GE Healthcare

Glatathion-Sepharose 4B; GE Healthcare

Nickel-NTA-Agarose

ProteinA und ProteinG-Sepharose; GE Healthcare

3.15. Kommerzielle Kits

Absolute™ QPCR SYBR Green Mix; Abgene

dNTP Set; Fermentas

Gel Extraction Spin Kit; Genomed

JETSTAR Plasmid Purification MAXI Kit; Genomed

Luciferase Assay System; Promega

E.Z.N.A cycle pure Kit; PeqLab

PCR Purification Kit; Qiagen

peqGOLD DNase I Kit (RNase frei); Peqlab

RNA-Mini-Kit; Seqlab

TNT T3 Coupled Reticulocyte Lysate Transcription/Translation System; Promega

3.16. Sonstige Chemikalien

Tetramethyl-Benzidin; Sigma

Propidiumiodid; Applichem

Protogel AA/BA-Mischung; National Diagnostics

Enlight Enhancing Solution; MoBiTec

Kernhistone aus Kalbsthymus; Roche Diagnostics GmbH

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien und Substanzen wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Applichem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München) und Merck (Darmstadt) bezogen.

3.17. Sonstige Verbrauchsmaterialien

96-well PCR-Platte; Greiner

Amersham Hyperfilm MP; GE Healthcare

Elektroporationsküvetten; PeqLab

FACS-Röhrchen 5 ml; Sarstedt

Fuji Medical X-Ray Film für ECL; Fuji Foto Film

Hyperfilm MP für Autoradiographie; Amersham Biosciences

Intensifying Screen Biomax Transcreen; BioMax

Multiply-Pro Gefäß 0,2 ml, PP; Sarstedt

PVDF Transfer Membran; Millipore

Reaktionsgefäß 1,5 ml; Greiner

Reaktionsgefäß 2 ml; Greiner

Selbsklebende Folie für 96-well Platten; ThermoFisher

StrataClean Resin; Qiagen

Whatman-Filterpapier; Schleicher und Schuell

3.18. Geräte

ÄktaTM Purifier 10 System; GE Healthcare

BD FACSCalibur; BD Biosciences

Berthold Lumat LB 9507 Luminometer;

Blot-Apparatur; Bio-Rad

CO₂-Inkubatoren; SANYO

Elektroporator; BioRad

Filmentwicklermaschine X-Omat-2000; Kodak

Mxp3000P qPCR; Stratagene

NanoDrop ND-1000; PeqLab

qPCR Thermocycler MX 3000P; Stratagene

SDS-Gelelektrophoresekammer Mini-Protean System; Bio-Rad

Seal-Gerät, Abgene

Semi-Dry-Blotter; Roth

Sonifikator; Bandelin

Stereomikroskop, Binokular MZ 125 mit Kamera Leica DC 300; Leica Microsystems

Thermocycler; Biometra

4. Methoden

4.1. Molekularbiologische Techniken

4.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Material	Zusammensetzung
LB-Agarplatten	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 177mM NaCl; pH 7,0; autoklaviert
SOB-Medium	2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; autoklavieren und dann 10 mM MgSO ₄ und 10 mM MgCl ₂ zugeben
TB-Lösung	250 mM KCl; 55 mM MnCl ₂ ; 15 mM CaCl ₂ ; 10 mM PIPES pH 7,0; steril filtrieren

Der Bakterienstamm wurde auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen. Von dieser Platte wurde eine Kolonie zum Animpfen einer 10 ml Übernachtskultur in LB-Medium verwendet. Am nächsten Tag wurde eine 250 ml Kultur in SOB-Medium inokuliert und bis zu einer OD von 0,55 - 0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann in gekühlte 50 ml Kunststoffröhrchen überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie bei 3.650 UpM (SS34) und 4°C für 10 min pelletiert. Die Pellets wurden in 20 ml eiskalter TB-Lösung resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 3650 UpM und 4°C für 10 min wurden die Pellets wiederum in 20 ml TB-Lösung resuspendiert und mit 1,5 ml DMSO versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen im Kühlraum bei 4°C in 200 µl Aliquots aufgeteilt. Diese Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz betrug 10^7 - 10^9 Transformanten pro pmol Plasmid DNA.

4.1.2. Transformation kompetenter Bakterien

Material	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 177mM NaCl; pH 7,0; autoklaviert
Chemisch kompetente Bakterien	siehe 4.1.1
LB-Agarplatten	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium; entsprechende Antibiotika
Antibiotikum	Ampicillin, Endkonzentration 50 µg/ml Kanamycin, Endkonzentration 25 µg/ml

Die Transformation der chemisch kompetenten *E. coli*-Stämme DH5 α oder BL21 DE3 erfolgte durch Hitzeschock. Zunächst wurden die Aliquots langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 50 ng - 1 μ g DNA oder 5 - 10 μ l eines Ligationsansatzes zu 100 - 200 μ l Bakterien wurde der Ansatz 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte durch 90 Sekunden Inkubation bei 42°C. Die Bakteriensuspension wurde danach 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 500 μ l LB-Medium wurde die Bakteriensuspension für 30 min bei 37°C inkubiert, um die Expression der Resistenzgene zu begünstigen. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Aarplatten ausplattiert.

4.1.3. Maxi- Plasmidpräparation aus *E. coli*

Material	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 177mM NaCl; pH 7,0; autoklaviert
E1	50 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0; RNase A 100 μ g/ml
E2	200 mM NaOH; 1 % SDS
E3	3 M KOAc; pH 5,5
E4	600 mM NaCl; 100 mM NaOAc; 0,15 % Triton X-100; pH 5,0
E5	800 mM NaCl; 100 mM NaOAc; pH 5,0
E6	1,25 M NaCl; 100 mM Tris; pH 8,5
Isopropanol	100 %
NaCl	5 M
EtOH	70 %ig und 100 %ig
3 M Natriumacetat	0,3 M Endkonzentration

Die Präparation von Plasmiden aus einer 400 ml Bakterienkultur erfolgte mit dem Jet Star Plasmid Maxi Kit von Genomed. Die 400 ml-Übernachtskultur wurde bei 4000 Upm bei 4°C pelletiert und das Pellet in 10 ml kaltem E1 gelöst. Nach 5 min Inkubation erfolgte die Lyse der Bakterien durch Zugabe von 10 ml E2 und unter vorsichtigem, aber gründlichem Mischen. Die Zugabe von 10 ml E3 bewirkt das Ausfallen von Kalium-Dodecyl-Sulfat, das mit Proteinen und genomischer DNA einen Komplex bildet und mit Zelltrümmern assoziiert bleibt. Somit verblieben nach Zentrifugation für 30 min bei 13000 Upm und 4°C im Überstand Plasmide und kleine Fragmente genomischer DNA. Zur weiteren Aufreinigung wurde der Überstand durch eine Mullkompressen auf eine Säule gegeben, die zuvor mit 30 ml E4 äquilibriert wurde. Nach dem Auftrag des Lysates wurde die Säule mit insgesamt 60 ml E5

gewaschen. Die Elution erfolgte mit 15 ml E6 unter Hochsalzbedingung und durch Einstellen eines neutralen pH-Wertes. Das Eluat wurde in 10 ml Isopropanol aufgefangen und gründlich gemischt. Nach 30 min Zentrifugation bei 4800 Upm und 4°C wurde das Pellet zunächst getrocknet und dann in 300 µl A. bidest. gelöst. In einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wurde dann 15 µl 5 M NaCl vorgelegt und die DNA-Lösung dorthin überführt. Nach Zugabe von 900 µl 100 % EtOH erscheint nach dem Mischen eine DNA-Flocke. Um Salzreste der präzipitierten DNA zu entfernen, wurde diese DNA-Flocke zweimal in 70 % EtOH gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet konnte dann je nach Größe in 100 - 400 µl A. bidest. aufgenommen werden.

4.1.4. Mini-Plasmidpräparation aus *E. coli* nach LiCl-Methode

Material	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 177mM NaCl; pH 7,0; autoklaviert
E1	50 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0; RNase A 100 µg/ml
E2	200 mM NaOH; 1 % SDS
E3	3 M KOAc; pH 5,5
LiCl	9 M
Isopropanol	100 %
EtOH	70 %ig und 100 %ig

Die Mini-Plasmidpräparation erfolgte mit den Puffern E1 - E3 des Jet Star Plasmid Maxi Kit von Genomed und anschließenden Präzipitationsschritten. Eine 1,5 ml Übernachtskultur in LB Medium wurde bei 5000 Upm für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 200 µl kaltem E1 resuspendiert. Für die Lyse der Bakterien wurden 200 µl E2 zugegeben und gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurde die Suspension mit 200 µl E3 neutralisiert. Zur Erhöhung der Plasmidausbeute wurde der Ansatz nun für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend zur Abtrennung der Proteine für 10 min bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl 100 % EtOH versetzt und 15 min bei -20°C inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C wurde das Pellet in 200 µl A. bidest. gelöst, mit dem gleichen Volumen einer 9 M LiCl-Lösung versetzt, 15 min bei -20°C inkubiert und dann zentrifugiert. Das führte zur Abtrennung der RNA als Präzipitat. Um die im Überstand gelöste DNA nun von den Salzverunreinigungen zu reinigen, wurde der Überstand (400 µl) mit 300 µl Isopropanol

versetzt und 15 min bei -20°C inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 13000 UpM wurde das Pellet 2 x mit 70 % EtOH und 1 x mit 100 % EtOH gewaschen, dann luftgetrocknet und in 50 µl A. bidest. gelöst.

4.1.5. Konzentrationsbestimmung des Nukleinsäuregehalts

Die DNA- oder RNA-Konzentrationen wurden durch Messung von 1 µl der unverdünnten nukleinsäurehaltigen Probe mit dem NanoDrop ND-1000 bestimmt. Die Konzentration wird photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Der automatisierten Berechnung der Konzentration liegt dabei zugrunde, dass bei einer Schichtdicke von 1 cm eine OD von 1 einer Konzentration von 50 ng/µl doppelsträngiger DNA, 40 ng/µl RNA und 20 ng/µl Oligonukleotiden entspricht. Als Maß für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung wird das Verhältnis aus Absorption bei 260 nm für Nukleinsäuren und Absorptionen bei 280 nm für aromatische Aminosäurereste herangezogen. Bei DNA spricht ein Verhältnis von 1,8 für ein reines Präparat, bei RNA ein Verhältnis von 2,0 für eine reine -Präparation. Sind die Werte kleiner als 1,8 oder 2,0 befinden sich Proteine in der Präparation.

4.1.6. Restriktion von DNA

Material
Restriktionsenzyme (Fermentas oder New England Biolabs)
10x Puffer (vom Hersteller mitgeliefert)

Restriktionsenzyme sind Endonucleasen, die das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA sequenzspezifisch schneiden. Dabei können an der Restriktionsstelle klebrige (*sticky ends*)- oder stumpfe Enden (*blunt ends*) entstehen. Der Berechnung der benötigten Enzymmenge pro µg DNA liegt zugrunde, dass eine Unit Enzym 1 µg Lambda DNA unter optimalen Bedingungen in einer Stunde schneidet:

$$\frac{\text{Schnittstellen in DNA} * \text{Größe des } \lambda - \text{Genoms (42 kbp)}}{\text{Schnittstellen in } \lambda - \text{Genom} * \text{Größe der DNA}} = U/\mu g \text{ DNA}$$

Die Pufferbedingungen für den Restriktionsverdau wurden entsprechend der Angaben des Herstellers angesetzt. Gegebenenfalls wurde der Ansatz nach dem Verdau 20 min bei 65°C inaktiviert.

4.1.7. Auffüllen des 5'-Überhang mit Klenow-Fragment

Für einige Klonierungsstrategien ist es notwendig 5'-Überhänge so aufzufüllen, dass ein stumpfes DNA-Ende entsteht. Dafür macht man sich die enzymatische Aktivität des Klenow-Fragmentes zu nutze. Das Klenow-Fragment ist das große Protein-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, das bei dem Verdau durch Subtilisin entsteht. Es enthält eine 5'-3'-Polymerase-Aktivität sowie eine 3'-5' Exonuklease-Aktivität (*proofreading*-Aktivität), die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität ist abgespalten (Klenow and Henningsen 1970).

Komponente	Mengen für 20 µl Ansatz
DNA	0,1 - 0,4 µg
10x Klenow-Reaktionspuffer	2 µl
dNTP Mix, 2mM	0,5 µl (0,05 mM Endkonzentration)
Klenow-Fragment	0,1 - 0,5 µl (1 - 5 Units)
A. bidest. (Nuklease frei)	ad 20 µl

Der Ansatz wurde zunächst bei 37°C für 10 min inkubiert und dann bei 75°C für 10 min hitzeinaktiviert.

4.1.8. 5' Dephosphorylierung von Vektoren

Um eine Religation von linearisierten Vektoren zu vermeiden, wurde eine 5'-Dephosphorylierung der geschnittenen Vektoren durchgeführt. Dabei macht man sich die alkalische Phosphatase zu Nutze, die im alkalischen Milieu die 5'-überhängenden Phosphatgruppen der DNA entfernt.

Komponente	Mengen für 20 µl Restriktionsansatz
1 M Tris pH 9,5	2 µl (0,1 M)
Calf Intestine alkaline phosphatase (CIAP) Invitrogen	1 µl (1 Unit)

Nach der Restriktion wurden dem Ansatz 1/10tel des Volumens 1 M Tris (pH 9,5) und 1 Unit CIAP zugefügt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 65°C für 15 min abgestoppt.

4.1.9. Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese kann DNA bzw. RNA nach der Größe aufgetrennt werden. Dabei dient der Farbstoff Ethidiumbromid, der in die Nukleinsäuren interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert, dem Nachweis der DNA bzw. RNA.

Material	Zusammensetzung
1 x TBE	89 mM Tris; 0,9 mM EDTA; 89 mM Borsäure; pH 8,4
6 x Orange G-Probenpuffer	60 mM Tris pH 7,5; 30 mM NaAc; 12 mM EDTA; 60 % (w/v) Glycerin; 0,36 % (w/v) Orange G
Agarose	0,8 % - 3 % in 1 x TBE
DNA-Standard	4 µl GeneRuler™ DNA Ladder Mix; Fermentas

Für ein Gel wurde die entsprechende Menge Agarose in 100 ml Elektrophorespuffer (1 x TBE) aufgekocht. Die Agarosegellösung wurde mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und handwarm gegossen. Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Taschen geladen. Der Gellauf erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 10 V/cm Elektrodenabstand an die Pufferkammer für ca. 30 - 60 min. Die Banden wurden im UV-Licht analysiert und dokumentiert.

4.1.10. Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Agarosegel

Material
Skalpell (steril)
Genomed Gel Extraktion Kit
UV-Schirm

Für die Präparation eines Fragmentes aus einem Restriktionsverdau wurden zunächst je zwei Taschen des Kammes für das Agarosegel abgeklebt um ein möglichst großes Volumen auftragen zu können. Nach der Elektrophorese wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Masse des Agarose-Blockes bestimmt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Gel Extraction Spin Kit von Genomed entsprechend den Angaben des Herstellers.

4.1.11. Aufreinigung von Vektoren und DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von Vektoren oder Fragmenten erfolgte mit dem E.Z.N.A. cycle pure Kit von PeqLab entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten

nach der Chromatinimmunpräzipitation (siehe 4.4.24) erfolgte mit dem PCR Purification Kit von Qiagen nach Herstellerangaben.

4.1.12. Ligation von DNA

Bei der Ligation von DNA werden zwei Enden von DNA-Molekülen unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxyl-Gruppe des einen und der 5'-Phosphatgruppe des anderen Endes kovalent verknüpft. Diese Reaktion wird durch DNA-Ligasen katalysiert. In der Molekularbiologie wird häufig die Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet. Das Enzym katalysiert die Ligation von klebrigen Enden oder stumpfen Enden doppelsträngiger DNA.

Komponente	Mengen für 10 µl Ligationsansatz
T4 DNA Ligase (Invitrogen) 1U/µl	1 µl (1U)
10 x Ligasepuffer	1 µl
DNA-Fragment (Insert)	variabel
Vektor	50 - 100 ng
A. bidest. (Nuklease frei)	ad 10 µl

Das Fragment (*Insert*) und der Vektor sollten im Ligationsansatz in äquimolaren Mengen vorliegen. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und dann in kompetente *E.coli* DH5α transformiert.

4.1.13. DNA-Sequenzanalyse

Sequenzierungen erfolgten durch die Firma AGOWA Genomics. Dafür wurden 10 µl mit 100 ng/µl Plasmid in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit 4 µl 5pmol/µl Primer versetzt. Wahlweise konnten Universal-Primer der Firma ausgewählt werden.

4.1.14. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Als Polymerasekettenreaktion (PCR) bezeichnet man die spezifische Amplifikation von DNA (Template) mittels einer DNA-abhängigen Polymerase. Die Spezifität wird durch die Bindung zweier Oligonukleotide (Primer) an die komplementäre Sequenz der DNA gewährleistet. Gleichzeitig liefern die Primer die für die Amplifikation nötigen 3'-OH-Enden. Die Verwendung der thermostabilen Taq-Polmerase ermöglicht die Automatisierung der PCR in Thermozyklern. Durch die Wiederholung von Denaturierung, Primerbindung und Kettenverlängerung kommt es zur Verdopplung des Amplifikates in jedem Zyklus.

Ein typischer PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Mengen für 25 µl PCR-Ansatz
Template DNA	50 - 100 ng
10x Reaktionspuffer der DNA-Polymerase	2,5 µl
DNA-Polymerase (Taq)	1 µl
dNTP Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl
50 mM MgCl ₂	0,75 µl (2 mM Endk.)
Primermix (Vorwärts- und Rückwärtsprimer je 10 pmol/µl)	1 µl
A. bidest (Nuklease frei)	x µl (ad.25 µl)

Ein PCR-Programm enthielt folgende Schritte:

Schritt	Temperatur	Zeit (bei 1000 bp)	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
2. Denaturierung	95°C	30 Sekunden	x 20 - 40
3. Primerbindung	50 - 60°C	30 Sekunden	
3. Kettenverlängerung	72°C	30 Sekunden	
4. Kettenverlängerung	72°C	10 min	

Die Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und unter dem UV-Schirm analysiert

4.1.15. Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Im Vergleich zur herkömmlichen Endpunkt-PCR wird bei der quantitativen PCR (qPCR) die Amplifikation der DNA durch Interkalation eines Fluoreszenzfarbstoffes detektiert. Der hier verwendete Reporterfarbstoff Sybr-Green interkaliert in doppelsträngige DNA und emittiert durch Anregung bei 494 nm Licht bei 521 nm. Diese Lichtemission wird während jedes Amplifikationszyklus durch Photosensoren des *Lightzyklers* gemessen. Der hier verwendete Mix Absolute™ QPCR SYBR green Mix von Abgene enthält neben Sybr-Green, die DNA-abhängige Polymerase, Polymerasepuffer, MgCl₂ und dNTPs. Die Polymerase wurde vom Hersteller so modifiziert, dass sie zunächst bei 95°C für 15 min aktiviert werden muss (*hot-start* Polymerase). So wird eine unspezifische Amplifikation vor Beginn der eigentlichen PCR-Reaktion verhindert. Die Primer für die qPCR wurden so entworfen, dass sie eine Sequenz von 60 – 300 bp umspannen und eine Annealing-Temperatur von 60°C besaßen.

Ein typischer Ansatz enthielt folgende Zusammensetzung.

Komponenten	Verwendete Menge für 25 µl qPCR-Ansatz
Template DNA cDNA 2 - 5 ng/µl oder Chromatin 1:8	6 µl
ABsolute™ QPCR SYBR Green Mix	12 µl
Primermix (10 µM)	0,25 µl
A. bidest (Nuklease frei)	ad 25 µl

Ein PCR-Programm enthielt folgende Schritte:

Schritt	Temperatur	Zeit (bei 60 – 300 bp)	Zyklen
1. Aktivierung	95°C	15 min	
2. Denaturierung	95°C	15 Sekunden	x 20 - 40
3. Primerbindung	60°C	15 Sekunden	
4. Elongation	72°C	15 Sekunden	
5. Schmelzkurve	55 - 95°C		

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem *Threshold Cycle* oder CT-Wert. Der CT-Wert ist definiert als der PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die Auswertung erfolgte nach der vergleichenden Quantifizierung mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Dabei wird der CT-Wert des Gens von Interesse (CT_{GOI}) mit dem CT-Wert eines unveränderten Haushaltgens ($CT_{Normalizer}$) abgeglichen.

$$\Delta C_{T_{GOI}} = C_{T_{GOI}} - C_{T_{Normalizer}}$$

Um verschiedene Bedingungen miteinander vergleichen zu können, wird der ΔC_T -Wert der Probe als fache Differenz relativ zum ΔC_T -Wert einer Kontrollprobe, dem Kalibrator, ausgedrückt ($\Delta\Delta C_T$). Dabei entspricht der $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Kalibrator-Probe gleich 1.

$$\Delta C_{T_{Kal}} = C_{T_{Kal}} - C_{T_{Normalizer}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_{Kalibrator}} - \Delta C_{T_{GOI}}$$

Da eine Änderung um einen CT einer Verdopplung des Amplifikates entspricht, gilt eine exponentielle Beziehung.

$$\text{Fache Expression} = 2^{(\Delta\Delta C_T)} = 2^{(\Delta C_{T_{Kal}} - \Delta C_{T_{GOI}})}$$

Die Reaktionen wurden als technische Triplikate durchgeführt. Daraus ergaben sich Standardabweichungen der Probe (S_{GOI}) und des Haushaltgens (S_{Norm}). Die Berechnung der Standardabweichung (s_{rel}) erfolgte nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetzes.

$$s = \sqrt{s_{GOI}^2 + s_{Norm}^2}$$

$$s_{rel} = \sqrt{(\Delta\Delta CT * \ln 2)^2 * 2 * s^2}$$

Für die Rekrutierung eines Proteins an ein bestimmtes DNA-Fragment in der ChIP-Analyse errechnet sich aus der Menge an ChIP-DNA im Vergleich zu einem Kontrollantikörper (IgG) oder zu % Input (% Inp) mit folgender Formel.

$$\Delta CT = CT_{\%Inp/IgG} - CT_{ChIP}$$

Wird die ChIP auf den CT-Wert des Kontrollantikörpers bezogen, gilt folgende Formel.

$$\Delta CT = CT_{Kontrolle} - CT_{ChIP}$$

$$\text{Rekrutierung} = 2^{\Delta CT}$$

Die Standardabweichung berechnet sich wie folgt.

$$s = \ln 2 * CT_{\%Inp/IgG} * \sqrt{s_{\%Inp \text{ oder Kontrolle}}^2 * s_{ChIP}^2}$$

4.1.16. Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Präparation erfolgte mit dem RNA-Mini-Kit von Seqlab nach den Angaben des Herstellers. Um Kontaminationen mit DNA zu vermeiden wurde ein DNA Verdau auf der Säulenmembran durchgeführt. Dazu wurde 1,5 µl DNase I in 75 µl DNaseI-Puffer pro Säulchen verdünnt, auf die Säule pipettiert und 20 min inkubiert. Die Elution erfolgte mit 50 µl RNase freiem Wasser.

Material
RNA-Mini-Kit; Seqlab
peqGOLD DNase I, (20 U/µl); Peqlab
peqGOLD DNase I Puffer; Peqlab

4.1.17. Reverse Transkription

Um die Expression eines Gens durch PCR nachzuweisen, muss die RNA mit einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Dafür verwendet man eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase), die mit Hilfe eines Primers entlang einer RNA-

Matrize einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. In dieser Arbeit wurden OligodT Primer verwendet, die an den PolyA-Schwanz von mRNA binden. Zunächst wurden je nach Ausgangsmenge 100 ng - 2 µg RNA auf 13 µl aufgefüllt und dann mit 2 µl Mix 1 versetzt.

Komponenten Mix 1	Menge pro Reaktion
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
OligodT (17mer, 0,5 µg/µl)	1 µl

Um das Binden der OligodT Primer zu ermöglichen, wurden die Ansätze 5 min bei 65°C denaturiert und dann auf 4°C abgekühlt. Dann erfolgte die Zugabe von je 10 µl des Mix 2 für die reverse Transkription.

Komponenten Mix 2	Menge pro Reaktion
5 x FS-Puffer	5 µl (1 x)
DTT (0,1 M)	2 µl
Ribolock	0,5 µl
MMLV-reverse Transkriptase	0,5 µl
A. bidest (Nuklease frei)	2 µl

Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermozykler für eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurde die MMLV-Reverse Transkriptase bei 75°C für 15 min inaktiviert. Die cDNA wurde mit Nuclease freiem Wasser für die Verwendung in der PCR verdünnt (2 - 5 ng/µl).

4.2. Zellbiologische Techniken

Die Behandlung und Kultivierung aller Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen. Angesetzte Lösungen wurden entweder mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert oder autoklaviert.

4.2.1. Kultivierung eukaryotischer adhärenter Zellen

Zelllinie	Vollmedium	Zellsplittung	Ablösung mit
HEK293	DMEM; 10 % FCS; 1 % Pen/Strep	2 - 3 Tage, 1:10 - 1:12	1:10 verd. 1 x Trypsin/EDTA
HeLa	DMEM; 10 % FCS; 1 % Pen/Strep	2 - 3 Tage, 1:12 - 1:15	1 x Trypsin/EDTA
MCF7	DMEM; 10 % FCS; 1 % Pen/Strep	2 - 3 Tage, 1:10	1:5 1 x Trypsin/EDTA
HD11	Basal Iscove's Medium, 8 % FCS, 2 % Hühner Serum; 1 % Pen/Strep	3 - 4 Tage, 1:8 - 1:10	1 x Trypsin/EDTA
QT6	Basal Iscove's Medium, 8 % FCS, 2 % Hühner Serum; 1 % Pen/Strep	2 - 3 Tage, 1:10	1:10 verd. 1 x Trypsin/EDTA

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Für das Vereinzeln der Zellen wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen mit 1 x PBS (4.2.4) gewaschen. Dann wurde der Zellrasen mit Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt und bei 37°C inkubiert bis alle Zellen abgelöst waren. Die Zellsuspension wurde mit Vollmedium verdünnt und ausgesät.

4.2.2. Kultivierung eukaryotischer Suspensionszellen

Zelllinie	Vollmedium	Zelldichte Zellen/ml	Zellsplittung
HL-60	RPMI; 10 % FCS; 1 % Pen/Strep	0,5 - 2 x 10 ⁶	2 - 3 Tage, 1:2 - 1:5
Jurkat	RPMI; 10 % FCS; 1 % Pen/Strep	1 x 10 ⁵ - 1,5 x 10 ⁶	2 - 3 Tage, 1:2 - 1:5
K562	RPMI; 10 % FCS; 1 % Pen/Strep	2 x 10 ⁵ - 1 x 10 ⁶	2 - 3 Tage Mediumwechsel, 1:3 - 1:5
Molt-4	RPMI; 20 % FCS; 1 % Pen/Strep	0,5 - 1,3 x 10 ⁶	2 - 3 Tage, 1:2 - 1:3

Alle Suspensionszelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kulturhaltung erfolgte in 175 cm² Zellkulturflaschen mit maximal 40 ml Suspension pro Flasche. Bei der Subkultivierung der Zellen wurde die nötige Menge Zellsuspension abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen.

4.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zelllinien	Zusammensetzung des Einfriermediums
HL-60; Jurkat; Molt-4; K562	30 % FCS; 10 % DMSO in RPMI
HD11; QT6	24 % FCS; 6 % Hühnerserum; 10 % DMSO Basal Iscove's Medium
HEK; HeLa; MCF7	30 % FCS; 10 % DMSO in DMEM

Für das Einfrieren von Zellen wurde für jedes Einfrierröhrchen 5 - 10 x 10⁶ Zellen verwendet. Adhärenente Zellen wurden auf 14,5 cm Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, das Zellpellet in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Diese wurden in einer Styroporbox im -80°C Gefrierschrank langsam herunter gekühlt und nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff bei -270°C überführt.

Für die Aussaat von Zellen wurden diese vorsichtig aufgetaut und in 10 ml Vollmedium aufgenommen. Diese Suspension wurde abzentrifugiert und der Überstand entfernt um das toxische DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde in Vollmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

4.2.4. Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem Hemazytometer (Neubauer-Zählkammer). Für jedes Großquadrat gilt folgende Berechnung.

Zellkonzentration = Verdünnung (Zellsuspension) x Zellzahl x 10⁴ Zellen/ml (Kammerfaktor).

4.2.5. Bestimmung der Zellvitalität durch Färbung mit Trypanblau

Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch defekte Membranen toter Zellen ins Cytosol eindringen kann. Dort bindet der saure Farbstoff an Zellproteine und färbt die Zellen blau. Es können so lebende von toten Zellen unterschieden werden.

Material	Zusammensetzung
Trypanblau	0,4 % (w/v) in PBS
1 x PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10mM Na ₂ HPO ₄ ; 2mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4

50 µl einer Zellsuspension wurden mit 150 µl 1 x PBS verdünnt und mit 250 µl Trypanblau-Lösung versetzt. Nach 5 min konnte die Lebend-Zellzahl mit Hemazytometer bestimmt werden.

4.2.6. Differenzierung von K562 Zellen mit Hemin und Cytosinarabinosid (Ara-C)

Die Zelllinie K562 wurde mit Hemin und Cytosinarabinosid (Ara-C) behandelt, um die erythroide Differenzierung der Zellen zu bewirken.

Material	Zusammensetzung
8 mM Hemin-Chlorid	19, 58 mg Hemin 0,3 ml 0,5 M Tris 0,3 ml 1N NaOH 0,35 ml 1N HCl 2,5 ml Wachstumsmedium
Ara-C	411 mM Stocklösung

Die Differenzierung von K562-Zellen wurde während der exponentiellen Wachstumsphase induziert. Die Induktion mit Hemin erfolgte für 3 Tage mit einer Endkonzentration an Hemin von 30 und 50 µM im Wachstumsmedium (Dean et al. 1981). Das Zytostatika Ara-C ist ein Nukleosid-Analogon und wird in der Zelle zu Cytosin-Arabinosid-Triphosphat verstoffwechselt. Es wird anstelle von Cytosintriphosphat in die DNA eingebaut und führt, wahrscheinlich über Hemmung der Primase, zum Abbruch der Replikationsgabel. Es wurde gezeigt, dass Ara-C ebenfalls die Differenzierung von K562-Zellen in die erythroide Linie bewirkt. Dafür wurden die Zellen für 5 Tage mit Ara-C mit einer Endkonzentration von 0,36 µM und 10 µM stimuliert.

Die Differenzierung wurde mit einer Benzidinfärbung und anhand der Expression des gamma-Globingens HBG1A mittels RT-qPCR nachgewiesen.

4.2.7. Benzidinfärbung (TMB)

Die Benzidinfärbung wird zum Nachweis von Hämoglobin und zur cytochemischen Färbung von Peroxidase-Aktivität verwendet. Der Farbstoff 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-

Dihydrochlorid (TMB) wird heutzutage anstatt der toxischen Substanz Benzidin verwendet. In dieser Arbeit wurde die Benzidinfärbung zum Nachweis der erythroiden Differenzierung von K562-Zellen verwendet. Dabei wird der Farbstoff durch die Pseudo-Peroxidase-Aktivität des Hämoglobins oxidiert und dadurch zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, der sich dann als schwarzes Präzipitat in den Hämoglobin-haltigen Zellen niederschlägt (Liem et al. 1979).

Material	Zusammensetzung
0,1 %ige 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid-Lösung (TMB)	10 mg TMB 1,2 ml Essigsäure 8,8 ml A. bidest.
0,9 % NaCl	450 mg NaCl 50 ml A. bidest.
30 % H ₂ O ₂	2 % in TMB-Lösung, frisch

Für die Färbung wurden 500 - 700 µl Zellsuspension abgenommen und bei 2000 UpM in einer Eppendorf Tischzentrifuge pelletiert. Das Zellpellet wurde dann zweimal mit 1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und nach den Waschschritten in 100 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl Benzidin-Lösung frisch mit 2 % Wasserstoffperoxid versetzt und zur jeden Probe gegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Suspension mit 200 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgewertet. Der Anteil der Benzidin-positiven Zellen von insgesamt 300 Zellen konnte nun bestimmt werden.

4.2.8. Wachstumskurven

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wachstum der Suspensionszelllinie K562 nach der Transfektion verschiedener siRNAs gemessen. Die Transfektion erfolgte wie unter 4.2.13 beschrieben. Am dritten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen gezählt und je 2 ml Zellsuspension in Triplikaten zu 1×10^4 Zellen/ml in 6-well-Platten ausgesät. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte täglich mit der Neubauer-Zählkammer unter Ausschluss der toten Zellen durch Trypanblaufärbung.

4.2.9. Wachstum in Methylcellulose

Methylcellulose ist ein chemisches Derivat der Cellulose. Das hydrophile Pulver löst sich in kaltem, jedoch nicht im warmen Wasser und bildet eine zähflüssige Lösung. Bei Raumtemperatur und 37°C liegt die Methylcellulose als Gel vor, im Kalten verflüssigt sie sich.

Die Fähigkeit von Zellen unabhängig von Adhärenz und Zell-Zell-Kontakten Kolonien innerhalb dieses Gels auszubilden, ist ein Charakteristikum transformierter Zellen.

Material	Zusammensetzung
Methocult M2334 (enthält FCS, BSA, rh Insulin, h Transferrin Eisen-gesättigt, 2-Mercaptoethanol)	80 ml
Nährmedium	19 ml
Penicillin/Streptomycin	1 ml
Iodo-Nitro-Tetrazolium-Chlorid 10 mg/ml in EtOH	1:10 in PBS (1 mg/ml)
1 x PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10mM Na ₂ HPO ₄ ; 2mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4

Die Methylcellulose wurde im Kühlschrank aufgetaut, in 600 µl Aliquots abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt.

Die Koloniebildung von K562-Zellen nach der Depletion verschiedener Proteine mittels siRNA wurde untersucht. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellsuspensionen zunächst 1:10 in Vollmedium verdünnt und ausgezählt. Ausgehend von dieser Verdünnung wurde in einem weiteren Verdünnungsschritt auf 8000 Zellen/ml verdünnt und davon je 200 µl auf ein Aliquot der aufgetauten Methylcellulose gegeben. Nach dem vortexen des Methylcellulose-Zellgemisches wurde kurz zentrifugiert und je 2 x 300 µl luftblasenfrei in 24-wells gegeben. Die äußeren Vertiefungen der 24-well Platten wurden mit 1 x PBS aufgefüllt, um ein Austrocknen der Methylcellulose während der Inkubation zu verhindern. Nach zwei Tagen Inkubation der Platten im Brutschrank bei 37°C wurden 50 µl des Farbstoffes INT (1:10 in PBS) vorsichtig auf die Zellen gegeben und weitere 5 Tage inkubiert. Das zunächst farblose INT wird dabei durch die Stoffwechselaktivität der Zellen zu einem roten Farbstoff umgesetzt. Die roten Kolonien wurden unter einem Stereomikroskop fotografiert.

4.2.10. Transfektion adhärenter Zellen mit DNA durch Calcium-Phosphat

Die Transfektion von DNA durch Calcium-Phosphat beruht auf der Bildung von Präzipitaten aus Calcium-Kationen und anionischen Phosphatgruppen der DNA unter definierten Pufferbedingungen. Diese Präzipitate können dann von den Zellen phagozytiert werden.

Diese Transfektionsmethode wurde im Rahmen dieser Arbeit für HeLa-, HEK-, HD11 und QT6-Zellen verwendet.

Material	Zusammensetzung
2,5 M CaCl_2	14,7 g in 40 ml A. bidest
2 x HBS	250 mM NaCl (7,305 g in 500 ml A. bidest) 50 mM HEPES (5,96 g in 500 ml A. bidest.) 1,5 mM Na_2HPO_4 (0,107 g (wasserfrei) per A. bidest.) auf exakt pH 7.08 mit NaOH eingestellt
TE	10 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA
1:10 TE	TE 1:10 in A. bidest verdünnt

Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Dichte von etwa 30 % Konfluenz besaßen. Für die Transfektion wurde TE-Puffer vorgelegt, 2,5 M CaCl_2 -Lösung dazugegeben und dann DNA dazu pipettiert. Nach jedem Schritt wurde gemischt. Das 2 x HBS wurde unter leichtem vortexen langsam zugetropft. Wie in der folgenden Tabelle aufgeführt, wurden je nach Plattengröße unterschiedliche Volumina und DNA-Mengen verwendet.

Gefäß (Fläche cm^2)	DNA (μg)	TE (μl)	CaCl_2 (μl)	2x HBS (μl)
6 cm Platte (21)	10	225	25	250
10 cm Platte (56)	25	450	50	500
14 cm (145)	50	900	100	1000

Nach 20 min Inkubation wurde das Gemisch tropfenweise auf die Zellen pipettiert und die Schalen leicht geschwenkt. Nach 16 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel indem der Zellrasen zunächst mit 1 x PBS gewaschen und dann mit neuem Medium versetzt wurde. Die Transfektionseffizienz wurde mit GFP überprüft. Die Ernte der Zellen erfolgte 48 Stunden nach Transfektion.

4.2.11. Transfektion adhärenter Zellen mit DNA durch Fugene HD

Material
OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen)
Fugene HD Reagenz (Roche)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HD11-Zellen mit DNA durch Fugene HD-Reagenz transfiziert. Die Zellen wurden so ausgesät, dass sie eine Konfluenz von ca. 30 - 50 % hatten. Von den getesteten Verhältnissen Fugene HD-Reagenz zu DNA stellte sich 3:1 am

effizientesten heraus. Je nach verwendeter DNA-Menge wurde das Volumen des Fugene HD Reagenz angepasst.

Gefäß (Fläche cm ²)	Opti-MEM I	DNA (µg)	Fugene HD
6-well (9,4)	100 µl	1,3 µg	3,9 µg

Die Transfektion erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers.

4.2.12. Transfektion adhärenter Zellen mit siRNA durch Oligofectamine

Material
OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen)
Oligofectamine (Invitrogen)
20 µM siRNA-Duplex

Für eine erfolgreiche Transfektion von siRNA mit Oligofectamine sollten die Zellen eine Konfluenz von 20 % bis maximal 30 % besitzen.

Die einzusetzende Menge an siRNA, OPTI-MEM I und Oligofectamine richtet sich nach der Größe der Kulturschale.

Gefäß (Fläche in cm ²)	siRNA (20µM), (µl) Ansatz A	OPTI-MEM I (µl) Ansatz A	Oligofectamin (µl) Ansatz B	OPTI-MEM I (µl) Ansatz B
6-well, (9,4)	10	175	3	15
6 cm, (21)	21	350	7	30
10 cm, (56)	50	875	15	75
14 cm, (145)	75	1400	25	125

Für die Transfektion wurden zwei Ansätze pipettiert. Ansatz A enthält OPTI-MEM I mit der siRNA und Ansatz B enthält OPTI-MEM I mit Oligofectamine. Beide Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann vorsichtig gemischt und 20 min inkubiert. Währenddessen wurde das Zellkulturmedium gegen DMEM ohne Serum und Antibiotikum ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden erfolgte die Zugabe von Vollmedium (mit FCS und Antibiotikum). Die Zellen konnten nach 48 – 72 Stunden nach der Transfektion geerntet werden.

4.2.13. Transfektion nicht-adhärenter Zellen mit siRNA durch Elektroporation

Die Suspensionszelllinie K562 wurde mit DNA oder siRNA durch Elektroporation transfiziert. Die Zellen wurden zwei Tage vor der Transfektion auf eine Dichte von $1,5 - 2 \times 10^5$ Zellen/ml gesplittet. Für die Transfektion wurden maximal 5×10^6 exponentiell wachsende Zellen und 24 μl (6 μg) siRNA oder 30 - 40 μg DNA verwendet. Die siRNA oder DNA wurde in sterilen Eppendorfgefäßen vorgelegt. Die benötigten Zellen wurden zunächst bei 1200 UpM zentrifugiert und das Pellet mit RPMI-Medium gewaschen. Das Pellet wurde in 300 μl RPMI-Medium pro Elektroporationsansatz aufgenommen und in die mit siRNA oder DNA vorbereiteten Eppendorfgefäße überführt. Die Suspension wurde vorsichtig mit der Pipette gemischt und dann in 4 mm-Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation erfolgte zügig unter Verwendung des BIO-RAD Elektroporators mit einem exponentiellen Programm bei 220 V, 960 μF . Die Zellen wurden sofort in 6 - 8 ml Vollmedium in 10 cm-Schalen aufgenommen.

4.2.14. Zellzyklusanalyse von K562-Zellen durch Propidiumiodid-FACS

Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) oder Durchflusszytometrie ist die Detektion und Messung von Signalen die von einzelnen Zellen erhalten werden, wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten. Dabei können mehrere physikalische Parameter wie Zellgröße und Granularität sowie Fluoreszenz-Parameter wie Intensität und Weite von Fluoreszenzsignalen einer einzelnen Zelle in einer größeren Zellpopulation bestimmt werden.

In proliferierenden Zellen verdoppelt sich die chromosomale DNA in der S-Phase des Zellzyklus. Daher ist der Gehalt der DNA nach der S-Phase in der G2/M-Phase doppelt so groß wie in einer postmitotischen Zelle in der G1-Phase. Die DNA einer Zelle kann durch die DNA interkalierende Farbstoffe wie Propidiumiodid nachgewiesen werden. Solche Farbstoffe können mit einem UV-Laser zur Lichtemission angeregt werden, wobei das Fluoreszenzsignal proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist. Diese Färbung wird dazu genutzt, den DNA-Gehalt und den Zellzyklusstatus von Zellen einer Zellpopulation im Durchflusszytometer zu analysieren. Diese Methode kann außerdem verwendet werden um den Anteil apoptotischer Zellen in einer Zellpopulation zu bestimmen. Typische Merkmale des apoptotischen Zelltodes sind die Fragmentierung der chromosomalen DNA in kleine Bruchstücke und die Fragmentierung des Zellkerns. Bei der DNA-Färbung von apoptotischen

Zellen beobachtet man einen DNA-Gehalt, der geringer ist als bei einer normalen Zelle der G1-Phase und der daher als sub-G1 bezeichnet wird.

Material	PI-Färbelösung für eine Probe
38 mM NaCitrat	400 µl
1.5 mM (1µg/µl) Propidiumiodid	15 µl (54 µM)
10 µg/µl RNase A	1 µl (24 µg/ml)

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Zellzyklusänderung von K562-Zellen nach Depletion bestimmter Proteine durch siRNA analysiert werden. Drei Tage nach der Transfektion mit siRNA wurden je 1×10^6 der exponentiell wachsenden Zellen in ein 15 ml Polysterol-Gefäß überführt und mit 1500 UpM (400 x g) für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Dann erfolgte ein Waschschrift mit 10 ml eiskaltem PBS und anschließender Zentrifugation. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und direkt in 4 ml eiskalten 100 %igen EtOH pipettiert. Dieses Gemisch sollte zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mindestens 30 min auf Eis inkubiert oder bei -20°C aufbewahrt werden. Das EtOH-Zellgemisch wurde dann bei 1500 UpM für 5 min bei 4°C zentrifugiert, das Zellpellet dann in 1 ml kaltem PBS aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1500 UpM wurde das Zellpellet mit 416 µl der PI-Färbelösung versetzt und 30 min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Da Propidiumiodid auch in RNA interkalieren kann, wurde diese durch Zugabe von RNase A in die Färbelösung entfernt. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt und im Durchflusszytometer mit langsamer Fließgeschwindigkeit mit dem FL2-A-Kanal in linearer Skalierung vermessen. Die Messung und Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen CellQuest-Pro und ModFit.

4.3. Chromatographische Techniken

Die für die Aufreinigung verwendeten Säulenmaterialien sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Säulenmaterial	Säulentyp	Volumen	Kapazität	Laufpuffer
Phosphocellulose (Kationenaustauscher)			20 mg/ml	20 mM Hepes pH 7,9 0 – 1M KCl 3 mM DTT 0,2 mM PMSF
EMD-DEAE-Fractogel 650 (S) (Anionenaustauscher)	XK 16	30 ml	10 mg/ml	20 mM Tris pH 8,0 0,01 – 1 M NaCl 10 % Glycerin
MonoQ (Anionenaustauscher)	HR 10/10	8 ml	5 mg/ml	0,5 mM DTT 1 mM PMSF

4.3.1. Reinigung von Proteinfractionen über Phosphocellulose

Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 5 Säulenvolumina 0,1 M KCl Laufpuffer wurden maximal 20 mg Protein pro ml Säulenmaterial aufgetragen. Die Elution erfolgte schrittweise. Die Durchbruchsfraction bei 0,1 M KCl (Phosphocellulose A (PCA)), sowie die Elutionsfraktionen bei 0,35 M (PCB), 0,6 M (PCC) und 1 M KCl (PCD) wurden aufgefangen.

4.3.2. Reinigung von Proteinfractionen über den Anionenaustauscher EMD-DEAE-Fractogel 650 (EDF)

Der EDF-Säulenlauf erfolgte bei einer Flussrate von 2 ml/min mit einem Druck von 0,2 – 0,3 MPa (max. Druck 3 MPa). Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina 0,05 M NaCl-Laufpuffer äquilibriert. Die Proteinmenge der als Input einzusetzenden PCA-Fraction wurde so berechnet, dass die maximale Ladekapazität von 300 mg nicht überschritten wurde. Die Salzkonzentration des Inputs wurde auf 50 mM Salz eingestellt. Der Auftrag des Inputs erfolgte über einem 50 ml Probenloop. Zur Elution wurde dann ein Salzgradient von 50 mM – 180 mM in 64 ml angelegt und je 8 ml-Fractionen gesammelt. Anschließend erfolgten zwei Elutionsschritte mit 450 mM NaCl und 1M NaCl. Die Fractionen wurden bezüglich ihres Gehalts an PRMT4 mittels Western Blot Analyse getestet.

4.3.3. Reinigung von Proteinfractionen über den Anionenaustauscher MonoQ

Der MonoQ-Säulenlauf erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min mit einem Druck von 2-3 MPa (max. Druck 4 MPa). Die Proteinmenge der als Input einzusetzenden EDF-Fractionen wurde so berechnet, dass die maximale Ladekapazität von 40 mg nicht überschritten wurde. Der Input wurde vor dem Auftrag auf 50 mM NaCl eingestellt. Der Auftrag erfolgte mit einem 25 ml Probenloop. Die Elution wurde durch Anlegen eines Salzgradienten von 50 – 250 mM NaCl in 40 ml durchgeführt. Es wurden 2 ml Fractionen gesammelt. Zur vollständigen Elution aller gebundenen Proteine wurde ein 1 M NaCl-Elutionsschritt angeschlossen. Die Fractionen wurden mittels Western Blot analysiert.

4.3.4. Analytische Gelfiltration

Die Gelfiltration dient der Auftrennung von Proteinen und Proteinkomplexen nach ihrer Größe. Die hier verwendeten Säulentypen und Materialien sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Säulenmaterial	Säulentyp	Bettvolumen V_c	Trennbereich	Laufpuffer
Superose 6 (Gelfiltration)	HR 10/30	ca. 24 ml	5 kDa – 5 MDa	20 mM Tris pH 8,0 10 % Glycerin 175 mM NaCl 0,5 mM DTT 1 mM PMSF
Superdex 200 (Gelfiltration)	HR 10/30	ca. 24 ml	10 – 600 kDa max. 1,3 MDa	

Um ein Verstopfen der Säulen zu verhindern, wurden hochmolekulare Nukleinsäuren in Proteinextrakten durch Behandlung mit Benzonase entfernt. Außerdem musste der zu analysierende Extrakt direkt vor der Beladung der Säule für 15 min mit 13000 UpM bei 4°C zentrifugiert werden, um größere Partikel und Präzipitate abzutrennen. Laufpuffer und Reinigungslösungen wurden vor der Verwendung mit einem BottleTop-Filter filtriert (0,22 µm).

Vor der Verwendung der Säulen für die Bestimmung von Komplexgrößen wurden die Säulen anhand von Eichproteinen bei 0,4 ml/min kalibriert. Es wurden 100 - 200 µg Protein in 100 µl Laufpuffer in einzelnen Läufen aufgetragen.

Eichprotein	Molekulargewicht
BSA Monomer	68 kDa
Dimer	136 kDa
IgG	150 kDa

	50 kDa 25 kDa
Ferritin	440 kDa
Thyroglobulin	670 kDa
Dextranblau	2000 kDa
Plasmid DNA	Void

Superose 6: Superose 6 ist ein Gelfiltrationsmedium aus hochvernetzten porösen Agarose-Partikeln, die sich durch eine hohe physikalische und chemische Stabilität auszeichnen. Mit Superose 6-Säulenmaterial können Proteine in der Gelfiltration über einen großen Trennbereich von 5 kDa - 5 MDa analysiert werden. Vor dem Gelfiltrationslauf wurde die Säule mit zwei Säulenvolumina Laufpuffer äquilibriert. Die Gelfiltrationsläufe erfolgten mit einer Flussrate von 0,3 - 0,5 ml/min, bei einem Druck von 1,2 MPa und einem maximalen Druck von 1,5 MPa. Um eine gute Auftrennung von Proteingemischen zu gewährleisten, wurde die Säule mit 100 µl (100 µl Probenloop) Extrakt mit maximal 5 mg Gesamtprotein beladen.

Superdex 200: Superdex 200 ist ein Gelfiltrationsmedium aus hochvernetzten porösen Agarose-Partikeln, das mit Dextranmolekülen kovalent vernetzt. Das Material hat eine hohe Auflösung im Bereich von 10 kDa – 600 kDa und ist chemisch sehr stabil. Vor dem Gelfiltrationslauf wurde die Säule mit zwei Säulenvolumina Laufpuffer äquilibriert. Die Gelfiltrationsläufe erfolgten mit einer Flussrate von 0,3 – 0,5 ml/min (max. 0.75 ml/min), bei einem maximalen Druck von 1,5 MPa. Um eine gute Auftrennung zu gewährleisten, wurde die Säule mit 100 µl (100 µl Probenloop) Extrakt mit maximal 10 mg Gesamtprotein beladen.

4.4. Proteinbiochemische Techniken

4.4.1. Präparation von Gesamtprotein aus Säugerzellen (IPH-Extrakt)

Material	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
IPH-Puffer	50 mM Tris pH 8,0; 150 oder 400 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % NP-40
IPH-Puffer ohne Salz	50 mM Tris pH 8,0; 5 mM EDTA; 0,5 % NP-40
Proteaseinhibitoren, 10 mg/ml	Aprotinin, Leupeptin und PMSF (1:1000 einsetzen)
MgCl ₂	1 M (6 mM Endkonz.)
Benzonase 250 U/μl	0,25 μl/mg Protein

Für die Herstellung von Gesamtzellproteinextrakten aus eukaryotischen Zellen wurden bewachsene Zellkulturschalen 2x mit PBS gewaschen. Anschließend gab man je nach Schalengröße PBS auf die Zellen (für 145 cm² Schalen z.B. 5 ml) und erntete sie mit einem Gummischaber. Die Zellen wurden in ein Plastikröhrchen überführt und bei 1200 UpM pelletiert. Das Zellpellet wurde dann im 3-fachen Volumen des Zellpellets in IPH-Puffer aufgenommen, 30 min bei 4°C unter Rotation lysiert und dann 15 min mit 13000 UpM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt den Gesamtzellproteinextrakt, welcher nach Zugabe von 10% Glycerin bei -20°C aufbewahrt wurde. Für Proteine, die stark mit dem Chromatin assoziiert sind, wurde die Extraktion modifiziert. Die Lyse erfolgte mit 400 mM NaCl im IPH-Puffer. Mit IPH-Puffer ohne Salz wurde dann eine Salzkonzentration von 200 mM eingestellt und anschließend zentrifugiert. Optional konnte vor der Zentrifugation ein Benzonaseverdau durchgeführt werden. Nach Zugabe von 62,5 Units Benzonase pro mg Protein und 7 mM MgCl₂ je ml Extrakt wurde für 40 min bei 4°C inkubiert und dann zentrifugiert.

4.4.2. Präparation von Kernextrakt nach Dignam

Material	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Puffer A	10 mM Hepes pH 7,9; 1,5 mM MgCl ₂ ; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT
Puffer S	20 mM Hepes pH 7,9; 10 % Glycerin; 420 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF
Puffer D	20 mM Hepes pH 7,9; 20 % Glycerin; 100 mM KCl; 0,2 mM

Material	Zusammensetzung
	EDTA; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF
Proteaseinhibitoren, 10 mg/ml	Aprotinin, Leupeptin und PMSF (10 µg/ml)

Die Zellkulturschalen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, die Zellen in je 5 ml PBS mit einem Gummischaber geerntet und bei 1200 UpM bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde nochmal mit 10 ml PBS gewaschen und bei 2500 UpM bei 4°C zentrifugiert. Das Volumen der Zellepellets wurde abgeschätzt und die Zellen im 2-fachen Volumen hypotonen Puffer A resuspendiert. Dies bewirkt ein Quellen der Zellen. Nach 5 - 15 min Inkubation bei 4°C wurde die Zellsuspension 8-mal mit einem Potter mit Pistill A behandelt, wobei die Zellmembranen zerstört wurden. Nach Zentrifugation für 5 min bei 2500 UpM wurde der Überstand, der die cytoplasmatischen Proteine enthielt, mit 10% Glycerin versetzt und eingefroren. Nach einer weiteren Zentrifugation des Pellets für 20 min bei 14500 UpM wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Kernpellet in Puffer S (2-3 ml für ein Pellet aus zehn 145 cm²-Schalen) aufgenommen. Um die Kerne aufzubrechen, wurde die Suspension 15-mal mit einem Pistill Typ B gepottert und im Anschluss für 30 - 45 min bei 4°C rotiert. Nach der Zentrifugation bei 14500 UpM bei 4°C für 30 min wurde der Überstand gegen 1 L Puffer D dialysiert. Danach wurde für 10 min bei 14500 UpM zentrifugiert um Präzipitate zu entfernen und der Überstand bei -80°C gelagert (Dignam et al. 1983).

4.4.3. Detergenzbasierte Präparation von Kernextrakt

Die Herstellung von Kernextrakt erforderte zunächst eine Abtrennung der cytoplasmatischen Zellbestandteile. Dies erfolgte mittels eines detergenzhaltigen, hypotonischen Puffers, durch den die äußere Zellmembran lysiert wurde, die Zellkerne aber intakt blieben.

Material	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Puffer A1	10 mM Hepes-KOH, pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,5 mM DTT; 0,04 % (v/v) NP-40
Puffer A2	10 mM Hepes-KOH, pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,5 mM DTT
Puffer B	50 mM Tris pH 8,0; 400 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 5 mM EDTA; 0,5 % (v/v) NP-40; 150 mM NaF; 2 mM Na ₃ VO ₄
Proteaseinhibitoren (10 mg/ml)	Aprotinin, Leupeptin und PMSF (10 µg/ml)

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann in je 5 ml PBS mit einem Gummischaber geerntet und bei 1200 UpM bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in Puffer A1 (500 µl für eine 145 cm²-Schale) resuspendiert, genau 5 min auf Eis inkubiert und bei 2000 UpM für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun cytoplasmatische Proteine. Um das Kernpellet von cytoplasmatischen Verunreinigungen zu reinigen, wurde es in Puffer A2 gewaschen und wieder zentrifugiert. Das Kernpellet wurde nun in 250 µl Puffer B aufgenommen und bei 4°C auf dem Rad für 20 min inkubiert. Dann wurde das Lysat bei 13000 UpM für 7 min zentrifugiert. Im Überstand befand sich nun die nukleäre Fraktion. Diese wurde bei -80°C eingefroren.

4.4.4. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 im sauren Milieu an kationische und unpolare Seitenketten von Proteinen bindet. Assoziiert der Farbstoff mit Proteinen, verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 470 nm zu 595 nm, was eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration erlaubt.

Material	Zusammensetzung
BSA	Konzentration 1 mg/ml
Bradford-Reagenz	0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250; 4,75 % (v/v) EtOH; 8,5 % Phosphorsäure
Plastikküvetten	1 mm Schichtdicke

Zunächst wurde eine Eichung des Bradford-Reagenz mit Hilfe eines Standardproteins durchgeführt. In Plastikküvetten wurde je 100 µl A. bidest. vorgelegt und diese mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µg BSA versetzt. Für die Bestimmung der Proben wurden parallel dazu ebenfalls Küvetten mit 100 µl A. bidest. vorbereitet und je 2 µl Proteinextrakt in Doppelbestimmungen pipettiert. Nach Zugabe von 900 µl Bradford-Reagenz wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand der Geradengleichung aus der Eichung wurde die Proteinkonzentration der Proben berechnet (Bradford 1976).

4.4.5. Ankonzentrieren von Proteinen mit Strataclean-Beads

Die Proteinlösung wurde mit der nötigen Menge Strataclean-Beads versetzt (Bindekapazität 100 µg/10 µl) und 15 min bei Raumtemperatur auf dem Rad inkubiert. Die Beads wurden

dann zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Beads in SDS-Probenpuffer aufgenommen (siehe 4.4.6).

4.4.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Bei der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Proteine in SDS-haltigem Probenpuffer unter Hitzeeinwirkung denaturiert. Das SDS lagert sich dabei an die Proteine und verleiht ihnen ein gleiches Verhältnis von Masse zu Ladung. Dies ermöglicht die Größenauftrennung der Proteine im elektrischen Feld.

Material	Zusammensetzung
10x SDS Laufpuffer	1,920 M Glycin; 250 mM Tris; 1 % SDS; pH 8,3
4x SDS Probenpuffer	250 mM Tris, pH 6,8; 2 % SDS; 20 % β -Mercaptoethanol; 40 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau
Tris für Sammelgel	1M pH 6,8
Tris für Trenngele	1M pH 8,8
Acrylamid	30 % AA : 0,8 % BA
SDS	20 % (w/v)
APS	20 % (w/v)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	
Isopropanol	

Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit dem Mini-Protean-System von Bio-Rad nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Glasplatten wurden vor Gebrauch mit EtOH gereinigt. Zunächst wurde die Polymerisation des Trenngels durch Zugabe von 1 % APS und 1 % TEMED gestartet und sofort zwischen die Glasplatten gegossen. Um eine Luftblasen freie und glatte Grenzschicht zu erhalten, wurde mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgeschüttet und mit Wasser abgespült. Das Sammelgel wurde dann mit 1 % TEMED und 1 % APS versetzt und der Kamm sofort eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde der Kamm gezogen, das Gel in die Elektrophoresekammer gespannt und die Elektrophoresekammer mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Die mit 4x SDS Probenpuffer versetzten Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert und danach in die Geltaschen pipettiert. Für die Größenbestimmung wurde ein Proteinmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 V für etwa 1 - 1,5 Stunden bei Raumtemperatur (RT). Die so aufgetrennten Proteine konnten nun

entweder angefärbt (siehe 4.4.7, 4.4.8) oder für einen Western Blot auf eine Membran transferiert werden (siehe 4.4.10; 4.4.11).

4.4.7. Coomassiefärbung von Proteingelen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau, der sich an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren anlagert, nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze liegt hier bei etwa 100 ng/Bande. (Neuhoff *et al.*, 1988)

Material	Zusammensetzung
Coomassie Färbelösung	25 % (v/v) EtOH; 50 % (v/v) Essigsäure; 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250
Coomassie Entfärbelösung	25 % (v/v) EtOH; 50 % (v/v) Essigsäure

Nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Gel je nach Dicke für 15 - 60 min in Coomassie Färbelösung inkubiert. Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden schwenkt man das Gel in der Entfärbelösung, bis der Hintergrund des Gels entfärbt war. Die Dokumentation erfolgt durch Scannen oder Trocknen des Gels.

4.4.8. Silberfärbung von Proteingelen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mit Hilfe einer Silberfärbung nachgewiesen werden. Dabei lagern sich Silberionen an die Proteine an und werden in einem Entwicklungsschritt im Alkalischen durch Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 - 1 ng/Bande (Neuhoff *et al.* 1988).

Material	Zusammensetzung
Fixiererlösung	50 % EtOH; 12,5 % Essigsäure
Waschlösung 1	50 % EtOH
Waschlösung 2	30 % EtOH
Lösung A	0,2 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 1 L A. bidest. (0,8 mM)
Lösung B	2 g AgNO_3 in 1 L A. bidest. 0,072 % (v/v) Formaldehyd
Lösung C	60 g NaCO_3 in 1 L A. bidest. 16 nM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1:50 Lsg. A) 0,0185 % (v/v) Formaldehyd

Zunächst wurde das Proteingel 2 Stunden oder über Nacht in Fixierlösung inkubiert. Dann erfolgten unter Schwenken des Gels 2-mal je 20 minütige Waschrhythmen mit 50%igem EtOH und ein Waschrhythmen mit 30 %igem EtOH für 20 min. Nach der Inkubation mit Lösung A für eine Minute wurde das Gel 3-mal 20 Sekunden mit A. bidest. gewaschen. Die Lösung B wurde frisch mit Formaldehyd versetzt bevor sie für eine 20 minütige Inkubation auf das Gel gegeben wurde. Dann erfolgten 3 Waschungen mit A. bidest. für je 20 Sekunden. Die Entwicklerlösung, Lösung C, wurde frisch mit Formaldehyd versetzt und das Gel darin 2 - 10 min entwickelt. Bei ausreichender Dunkelfärbung der Proteinbanden wurde die Inkubation abgebrochen indem 2-mal für je 2 min mit A. bidest. gewaschen wurde. Währenddessen dunkelten die Banden noch nach. Den endgültigen Stopp der Entwicklung erreichte man durch Überführen des Gels in Fixierlösung.

4.4.9. Analyse von Proteinen mit Maldi-TOF

Die Identifikation von Proteinbanden aus Silber gefärbten Gelen wurde von Jürgen Adamkiewicz, IMT Marburg, durchgeführt. Dafür wurden zunächst gefärbte Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und aus dem Gel extrahiert. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mittels MALDI-TOF.

4.4.10. Western Blot, nass

Mit dem Western Blot werden Proteine nach der Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese im elektrischen Feld auf eine Membran transferiert und dort immobilisiert.

Material	Zusammensetzung
Western Blot-Puffer	20 % (v/v) 10x SDS Laufpuffer (siehe 4.4.6); 20 % (v/v) Methanol
Methanol	
Whatman Papier 3MM	4 Stück pro Gel
PVDF-Membran	5x 9,5 cm

Die Blotapparaturen des Mini-Protean Systems von BIO-RAD wurden verwendet. Die PVDF-Membran musste vor dem Gebrauch 15 Sekunden mit Methanol aktiviert werden. Der Blot wurde nach folgendem Schema aufgebaut:

Anode (+) Schwamm

2 Whatman Papiere

PVDF Membran

SDS-Gel

Kathode (-) 2 Whatman Papiere

Der Transfer erfolgte bei 45 Volt. Die Zeitdauer des Blottens richtete sich nach der Proteingröße. Für kleine Protein von 10 - 20 kDa waren 45 min ausreichend, für 200 - 300 kDa Proteine wurde 3 Stunden unter Kühlung geblottet.

4.4.11. Western Blot, halbtrocken (*Semi-Dry*)

Die Methode wurde bei Proteingelen angewandt, deren Format nicht für das Mini-Protean Systems von BIO-RAD geeignet waren. Es wurden Semi-Dry Blot-Geräte von BIO-RAD oder Roth benutzt.

Material	Zusammenstellung
Semi-Dry Blotpuffer	25 mM Tris; 150 mM Glycin; 10% Methanol (pH 8,3)
Methanol	
Whatman Papier 3MM	4 Stück pro Gel
PVDF Membran	5 x 9,5 cm

Die PVDF-Membran musste vor dem Gebrauch 15 Sekunden mit Methanol aktiviert werden. Beim Semi-Dry Blotverfahren wurden Membranen und Whatman Papiere in Blotpuffer äquilibriert und dann horizontal auf der Basis (+ Anode) des Semi-Dry Blot-Gerätes aufgebaut.

Anode (Basis) 2 Whatman Papiere

PVDF Membran

SDS-Gel

Kathoden (Deckel) 2 Whatman Papiere

4.4.12. Ponceau S-Färbung

Durch Ponceau S-Färbung lassen sich Proteine, die auf Blotmembranen transferiert wurden nachweisen. Dabei bindet der Farbstoff Ponceau S reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Aminosäuren.

Material
Ponceau S-Färbelösung; (Sigma-Aldrich)
A. bidest.

Die Membran wurde etwa eine Minute in Ponceau S- Färbelösung geschwenkt und dann für einige Minuten mit A. bidest. entfärbt bis Banden sichtbar wurden.

4.4.13. Immunfärbung von Blot-Membranen

Die Immunfärbung dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen, die auf einer Membran immobilisiert sind.

Material	Zusammensetzung
TBS	50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl
Blocklösung	4 % Milchpulver in TBS; 0,5 % (v/v) Tween 20
BSA-Blocklösung	4 % BSA in TBS; 0,5 % (v/v) Tween 20
Erstantikörper	in Blocklösung verdünnt
Zweitantikörper (HRP-gekoppelt)	in Blocklösung 1 : 5000 verdünnt
TBS/Tween	TBS; 0,5 % (v/v) Tween 20
Luminol-Lösung	250 mM Luminol in DMSO
β -Coumarsiure-Lösung	90 mM β -Coumarsiure in DMSO
ECL Lösung 1	100 mM Tris pH 8,5; 0,03 % H_2O_2
ECL Lösung 2	100 mM Tris pH 8,5; 0,444 % (v/v) β -Coumarsiure, 1 % (v/v) Luminol Lösung
Röntgenfilm	Super RX, Fuji Medical X-Ray Film

Nach dem Transfer der Proteine (siehe 4.4.10; 4.4.11) wurden freie Proteinbindestellen auf der Membran durch Inkubation mit Blocklösung für 1 Stunde abgesättigt. Für einige Antikörper war es notwendig die Membran mit BSA-Blocklösung abzusättigen, um eine hohe Hintergrundfärbung zu vermeiden. Für die Bindung des spezifischen Erstantikörpers wurde dieser in Blocklösung verdünnt. Die Membran wurde mit der Erstantikörperverdünnung 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Um nicht gebundenen Antikörper

von der Membran zu entfernen, wurde diese anschließend 5-mal 5 min mit TBS/Tween 20 gewaschen. Der Zweitantikörper, der speziesabhängig nun den Erstantikörper binden sollte, wurde ebenfalls in Blocklösung verdünnt und mit der Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss 3-mal für 10 min mit TBS/Tween 20 und 1-mal 5 min mit TBS gewaschen. Mit der dann folgenden ECL (*Enhanced ChemoLumineszenz*)-Reaktion erfolgte der Nachweis des Zielproteins. Dafür wurde je ECL-Reaktion 10 ml ECL-1 und ECL-2 angesetzt und kurz vor der Entwicklung auf die Membran gegeben. Der Zweitantikörper ist an eine Peroxidase, die HRP (*Horse Radisch Peroxidase*), gekoppelt. Diese katalysiert unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid (ECL 1) die Oxidation von Luminol (ECL 2) in ein instabiles Zwischenprodukt, das unter Chemolumineszenz zerfällt. Diese Chemolumineszenz kann dann mit einem Röntgenfilm in der Dunkelkammer detektiert werden. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte mit dem X-Omat 2000 von Kodak.

4.4.14. Ablösen von Antikörpern von der Western Blot-Membran

Material	Zusammensetzung
TBS	50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl
Ablösepuffer	50 mM Tris pH 6,8; 4 % SDS; 1 % β -Mercaptoethanol

Um die Blot-Membran nach erfolgter Immunfärbung von den gebundenen Erst- und Zweit-Antikörpern zu befreien, wurde sie 30 min in 100 ml Ablösepuffer bei 65°C im Wasserbad erhitzt. Nach gründlichem Waschen in Wasser konnte die Membran für weitere Immunfärbungen verwendet werden.

4.4.15. Präparation von GST-Fusionsproteinen aus Bakterien

Zur Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen nutzt man die Affinität der Glutathione-S-Transferase an Glutathion-Sepharose aus.

Material	Zusammensetzung
LB/Glucose-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 177 mM NaCl; pH 7,0; 2 % Glucose und Antibiotika (Ampicillin 50 μ g/ml)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG); 1 M	1 mM
PBS/TritonX-100	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4; 1 % TritonX-100

Material	Zusammensetzung
Proteaseinhibitoren (10 mg/ml)	Aprotinin, Leupeptin und PMSF (10 µg/ml)
Glutathion-Sepharose	(Amersham)
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
GST-Elutionspuffer	25 mM Glutathion; 50 mM Tris; pH 8,0
Dialysepuffer	10 % Glycerin in PBS

Nach Transformation (siehe 4.1.2) des relevanten Plasmides in *E.coli* BL21 DE3 wurde eine 25 ml Übernachtskultur in LB/Glucose angesetzt. Aus dieser Kultur wurde eine 500 ml Kultur mit einer OD₅₉₅ 0,1 angeimpft und diese bei 37°C kultiviert. Nach Erreichen einer OD₅₉₅ von 0,6 wurde die Expression des GST-Fusionsproteins mit 1 mM IPTG induziert und weitere 3 Stunden kultiviert. Die Bakterien wurden dann bei 5.000 UpM pelletiert und anschließend in 10 ml PBS/TritonX-100 (inkl. Proteaseinhibitoren je 1:1000) resuspendiert. Zum Aufschluss der Bakterien wurde die Suspension 3-mal für 30 Sekunden bei 20 % sonifiziert und die Zelltrümmer bei 5.850 UpM für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Plastikröhrchen überführt, mit 300 µl Glutathion-Sepharose versetzt und für 2 - 16 Stunden (über Nacht) unter Rotation bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde dann bei 2.000 UpM für 5 min pelletiert und insgesamt viermal mit je 20 ml PBS/TritonX-100 und einmal mit PBS gewaschen. Das gebundene GST-Fusionsprotein wurde nun entweder an Glutathion-Sepharose gebunden aufbewahrt oder von der Sepharose eluiert. Das gebundene Fusionsprotein wurde mit Glycerin (finale Konzentration 10 %) versetzt und bei -80°C gelagert. Zur Elution wurde die Sepharose in einem Volumenteil Elutionspuffer aufgenommen und für 30 min unter Rotation bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde dann für 2 - 16 Stunden gegen PBS/10 % Glycerin dialysiert um das freie Glutathione zu entfernen.

4.4.16. Präparation von His-Fusionsproteinen aus Bakterien

Für die Aufreinigung von His-Fusionsproteinen wird die Komplexbildung zwischen den Imidazolringen des Histidins mit Ni²⁺-Ionen ausgenutzt.

Material	Zusammensetzung
LB/Glucose-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 177 mM NaCl; pH 7,0; 2 % Glucose und Antibiotika (Ampicillin 50 µg/ml)
IPTG (1 M)	1 mM
Bindepuffer:	10 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 % TritonX-100; 25 mM Imidazol

Material	Zusammensetzung
TBS/TritonX-100/25 mM Imidazol	
Waschpuffer: TBS/TritonX-100/10 mM Imidazol	10 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 % TritonX-100; 10 mM Imidazol
TBS	10 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 % TritonX-100
Dialysepuffer	TBS; 10 % Glycerin
Proteaseinhibitoren	Aprotinin, Leupeptin und PMSF je 10 mg/ml
Ni ²⁺ -Agarose-Kügelchen	
Elutionspuffer	500 mM Imidazol
Dialysepuffer	10 % Glycerin in TBS

Nach Transformation (siehe 4.1.2) des relevanten Plasmides in *E.coli* BL21 DE3 wurde eine 25 ml Übernachtskultur in LB/Glucose angesetzt. Aus dieser Kultur wurde eine 500 ml Kultur mit einer OD₅₉₅ 0,1 angeimpft und diese bei 37°C kultiviert. Nach Erreichen von OD₅₉₅ von 0,6 wurde die Expression des His-Fusionsproteins mit 1 mM IPTG induziert und weitere 3 Stunden kultiviert. Die Bakterien wurden dann bei 5.000 UpM pelletiert und anschließend in 10 ml Bindepuffer (inkl. Proteaseinhibitoren je 1:1000) resuspendiert. Zum Aufschluss der Bakterien wurde die Suspension 3-mal für 30 Sekunden bei 20 % sonifiziert und die Zelltrümmer bei 5.850 UpM für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Plastikröhrchen überführt, mit 300 µl Ni²⁺-Agarose versetzt und für 2 Stunden unter Rotation bei 4°C inkubiert. Die Ni²⁺-Agarose wurde dann bei 1200 UpM für 5 min pelletiert und insgesamt 4-mal mit je 20 ml Waschpuffer und einmal mit PBS gewaschen. Das gebundene His-Fusionsprotein wurde nun entweder gebunden an Ni²⁺-Agarose aufbewahrt oder eluiert. Das gebundene Fusionsprotein wurde mit Glycerin (finale Konzentration 10 %) versetzt und bei -80°C gelagert. Zur Elution wurde die Ni²⁺-Agarose in einem Volumenteil Elutionspuffer aufgenommen und für 30 min unter Rotation bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde dann für 2 - 16 Stunden gegen TBS/10 % Glycerin dialysiert um das Imidazol zu entfernen.

4.4.17. GST-Pulldown aus Zellextrakten

Material	Zusammensetzung
IPH-Puffer	50 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % NP-40
IPH-Waschpuffer	50 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % NP-40
4x SDS Probenpuffer	250 mM Tris, pH 6,8; 2 % SDS; 20 % β -Mercaptoethanol; 40 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau
BSA	5 mg/ml
Glutathion-Sepharose	

Mit einem Pulldown-Assay kann eine Interaktion zweier Proteine überprüft werden. Dabei wird mit einem an eine Matrix gebundenen Proteinpartner das interagierende, lösliche Protein aus einem Extrakt oder einer Proteinlösung herausgezogen.

Gleiche Mengen an Glutathion-Sepharose gebundenes GST und GST-Fusionsprotein (0,5 - 1 μ g) wurden auf je 50 μ l Glutathion-Sepharose aufgefüllt. Die Glutathion-Sepharose wurde in einem Gesamtvolumen von 500 μ l IPH-Puffer mit 200 μ g/ml BSA für 1 Stunde bei 4°C auf dem Rad geblockt. Parallel dazu wurden die einzusetzenden Mengen Zellextrakt (ca. 250 μ g pro Bedingung) mit 50 μ l Glutathion-Sepharose vorgereinigt, um unspezifische Interaktionen des Extraktes mit der GST-Sepharose zu entfernen (*Preclearing*). Nach der Inkubation wurde die Sepharose mit 5000 UpM für 5 min und die Extrakte mit 13000 UpM für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die Extrakte konnten dann mit der geblockten GST-Sepharose vereinigt werden. Das Gemisch wurde zunächst 2 Stunden bei 4°C rotiert, mit IPH-Puffer gewaschen und für 1 min bei 5000 UpM zentrifugiert. Der Waschschrift wurde insgesamt 6-mal wiederholt. Nach dem letzten Schritt wurde die GST-Sepharose in SDS-Probenpuffer aufgenommen um die gebundenen Proteine zu eluieren. Ca. 5 - 20 % Input wurden zusammen mit dem Pulldown-Proben mittels Western Blot-Analyse ausgewertet.

Die Inkubationszeiten für die Bindung sowie die Waschbedingungen mussten für die zu untersuchenden Interaktionen optimiert werden.

4.4.18. GST-Pulldown mit rekombinanten Proteinen

Mit einem GST-Pulldown-Assay mit rekombinanten Proteinen kann eine physikalische Interaktion zweier Proteine überprüft werden. Bei dieser Form des GST-Pulldowns werden an GST-Sepharose gebundene GST-Fusionsproteine mit löslichen, aus Bakterien aufgereinigten, rekombinanten Proteinen inkubiert.

Für den Pulldown wurde von jedem Protein eine Menge von 0,5 - 1 µg eingesetzt. Der Pulldown erfolgte wie unter 4.4.17 beschrieben, jedoch wurde auf ein *Preclearing* der Proteinlösung verzichtet.

4.4.19. *In vitro* Translation (IVT)

Die IVT wurde mit dem TnT[®] T3 Coupled Reticulocyte Lysate System von Promega laut Herstellerangaben durchgeführt. Dieses Kit erlaubt eine *in vitro* Transkription und Translation in einem Schritt. Zur Markierung des translatierten Proteins wurde ³⁵S-Methionin verwendet. Die Transkription erfolgte mit T7-RNA-Polymerase Promotoren.

4.4.20. GST-IVT-Pulldown

Bei dieser Form des GST-Pulldowns werden an GST-Sepharose gebundene GST-Fusionsproteine mit löslichen, *in vitro* translatierten Proteinen inkubiert.

Material	Zusammensetzung
Z' Puffer	25 mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl; 12,5 mM MgCl ₂ ; 20 % Glycerin; 0,1 % NP-40
DTT	200 mM
BSA	5 mg/ml
Bindepuffer für 20 µl Sepharose	400 µl Z' Puffer 2 µl 200 mM DTT 12 µl 5 mg/ml BSA
Waschpuffer NETN	20 mM Tris pH 8; 175 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0.5 % NP-40
4x SDS Probenpuffer	250 mM Tris, pH 6,8; 2 % SDS; 20 % β-Mercaptoethanol; 40 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau
Enlight Enhancing-Lösung	
Amersham Hyperfilm MP	

Es wurden gleiche Proteinmengen immobilisiertes GST bzw. GST-Fusionsprotein (ca. 0,5 - 1 µg) in den Pulldowns verwendet. Das Volumen der Sepharose-Kügelchen wurde mit Glutathion-Sepharose auf 20 µl aufgefüllt. Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Sepharose mit der entsprechenden Menge Bindepuffer zunächst 10 min bei RT rotiert. Die Proteine aus der IVT wurden im Vorfeld miteinander abgeglichen. Zwischen 0,1 - 10 µl der radioaktiv markierten Translationsprodukte wurden in die Suspension gegeben. Nach 45 min Inkubation unter Rotation bei RT wurde bei 2000 UpM zentrifugiert. Das Waschen der

Sepharose mit NETN Puffer erfolgte 4-mal. Die Sepharose wurde dann zur Elution der Proteine in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Eluate wurden zusammen mit Input in einem SDS-Gel aufgetrennt. Zur Verstärkung des radioaktiven Signals wurde das Gel 2 Stunden in Enlight Enhancing-Lösung gebadet (Fluorographie), dann getrocknet und 1 - 7 Tage bei exponiert.

4.4.21. *In vitro*-Methylierung

Die *in vitro* Methylierungsreaktion dient dem Nachweis der enzymatischen Aktivität von Argininmethyltransferasen. Als Methylgruppendonor wird radioaktiv markiertes S-Adenosyl-Methionin verwendet, sodass die Übertragung der Methylgruppe auf ein Substrat in der Fluorographie nachvollzogen werden kann. Als Quelle des Enzyms werden rekombinante, immunpräzipitierte PRMTs oder Extrakte verwendet. In dieser Arbeit wurde die enzymatische Aktivität aus chromatographischen Fraktionen analysiert.

Material	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
¹⁴ C-SAM	S-Adenosyl-L-[methyl- ¹⁴ C]-Methionin; 25 µCi/ml
Kernhistone aus Kalbsthymus (H3, H2B, H2A, H4)	20 µg/µl
Intensifying Screen Biomax Transcreen	
Amersham Hyperfilm MP	

Der Methylierungsansatz enthielt 1 - 5 µg des zu methylierenden Substrats (zB. 20 µg Kernhistone), 1 µl ¹⁴C-SAM und 5 - 15 µl der Enzymquelle. Der gesamte Ansatz wurde mit PBS auf 20 - 35 µl aufgefüllt und für 2 Stunden bei 30° - 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mit SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die getrocknete Membran wurde zusammen mit einem Intensifying Screen 1 - 7 Tage exponiert.

4.4.22. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient der Anreicherung oder Depletion eines Proteins aus einem Zellextrakt. Dabei wird die hohe Spezifität zwischen Antikörper und Antigen genutzt.

Material	Zusammensetzung
IPH-Puffer	50 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % NP40; 150 mM NaF; 2 mM Na ₃ VO ₄ ; Proteaseinhibitoren
Antikörper	spezifisch für das zu immunpräzipitierende Protein
Protein A Sepharose Protein G Sepharose	
4x SDS Probenpuffer	250 mM Tris, pH 6,8; 2 % SDS; 20 % β-Mercaptoethanol; 40 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau

Je nach Experiment wurden 500 µg - 2 mg Extrakt eingesetzt. Bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der verwendeten Extrakte wurden die Gesamtvolumina der Ansätze mit IPH-Puffer angeglichen. Nach der Zugabe der Antikörper (1 - 4 µg/mg Protein) erfolgte bei 4°C unter Rotation eine Inkubation von 4 – 16 Stunden. Parallel dazu wurde die Protein A/G-Sepharose mit 200 µg/ml BSA in IPH-Puffer mindestens für 2 Stunden bei 4°C geblockt um unspezifische Proteinbindung an die Sepharose zu minimieren. Um die Antikörper-Antigen-Komplexe aus dem Extrakt zu depletieren, wurden 10 - 20 µl der geblockten Protein A/G-Sepharose dazugegeben und für 2 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Danach wurde die Sepharose bei 5000 UpM in einer Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand abgenommen und die Sepharose 4 - 6-mal mit IPH-Puffer gewaschen. Das Sepharose-Pellet wurde in 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen um die gebundenen Proteine zu eluieren.

4.4.23. Coimmunpräzipitation

Für die Untersuchung von Interaktionen von Proteinen in einem Zellextrakt, wurde ein Partner mittels eines spezifischen Antikörpers immunpräzipitiert. In der Western Blot-Analyse wurde dann durch Immunfärbung überprüft, ob dieses Protein den potentiellen Interaktionspartner copräzipitiert, also gebunden hatte. Als Negativkontrolle wurde ein Kontrollantikörper der gleichen Spezies im Experiment mitgeführt.

Die Immunpräzipitation wurde so durchgeführt wie unter 4.4.22 beschrieben. Bei Auftreten von Hintergrund wurde ein zusätzlicher *Preclearing*-Schritt des Extraktes durchgeführt. Dafür wurde 20 µl geblockte Protein-A/G-Sepharose mit Extrakt für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Protein-A/G-Sepharose wurden die Extrakte in der IP

weiterverwendet. Außerdem wurden die Salzkonzentrationen im IPH-Puffer, Protein- und Antikörpermengen je nach Experiment optimiert. Um eine DNA-vermittelte Interaktion der potentiellen Interaktionspartner auszuschließen, wurden die Proteinextrakte vor der Immunpräzipitation mit 10 µg/ml Ethidiumbromid versetzt.

4.4.24. Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Mit dieser Methode kann überprüft werden, ob ein bestimmtes Protein mit einem definierten DNA-Abschnitt *in vivo* interagiert. Dazu werden DNA-assozierte Proteine durch Formaldehyd chemisch mit der DNA vernetzt (*Crosslinking*). Das Chromatin wird anschließend in kleine Bruchstücke fragmentiert. Dieses Chromatin wird dann für eine Immunpräzipitation gegen das zu untersuchende Protein eingesetzt. Nach Revertierung der kovalenten Vernetzungen zwischen DNA und Proteinen kann die DNA aufgereinigt werden. Die spezifische Quantifizierung der Menge immunpräzipitierter DNA-Fragmente ermöglicht eine Aussage über die Assoziation von Proteinen mit bestimmten Regionen der DNA.

Material	Zusammensetzung
Formaldehyd	Stocklösung 36,5 %
Glycin	2,5 M Glycin
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Lyse Puffer 1	5 mM PIPES pH 8; 85 mM KCl; 0,5 % NP40; incl. Proteinaseinhibitoren
Lyse Puffer 2	10 mM Tris Hcl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 % NP40; 0,1 % SDS; 1 % DOC (Natriumdeoxycholat); 1 mM EDTA; incl. Proteinaseinhibitoren
Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche)	halbe Tablette in 20 ml Lysepuffer
Protein A Sepharose Protein G Sepharose	
Wasch Puffer 1	20 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,1 % SDS; 1 % Triton X-100
Wasch Puffer 2	20 mM Tris pH 8,0; 500 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,1 % SDS; 1 % Triton X-100
Wasch Puffer 3	10 mM Tris pH 8,0; 1 % NP40; 1 % DOC (Natriumdeoxycholat); 1 mM EDTA; 0,25 M LiCl
TE Puffer	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA
Elutionspuffer	1% SDS; 0,1M NaHCO ₃ ; immer frisch ansetzen!
Reversionspuffer für 52 µl	20 µl 5 M NaCl

Material	Zusammensetzung
	10 µl 500 mM EDTA 20 µl 1 M Tris pH 6,5 2 µl 10 mg/ml Proteinase K 1 µl 10 mg/ml RNase A
BSA	20 mg/ml in TE
Lachssperma DNA	4 mg/ml; sonifiziert
Qiaquick PCR Purification Kit	
Proteinase K	20 mg/ml
RNase A	10 mg/ml

Chromatin-Crosslinking und Präparation: Für einen ChIP-Ansatz wurde eine 145 cm²-Platte oder mindestens 1 x 10⁷ Zellen/ml eingesetzt. Zunächst wurde die DNA mit den gebundenen Proteinen durch Zugabe von 1% Formaldehyd für 10 min kovalent vernetzt. Diese Reaktion wurde durch die Zugabe von 2,5 M Glycin in einer Endkonzentration von 125 mM und 5 min Inkubation abgestoppt. Das Medium wurde abgeschüttet und die Zellen vor dem Ernten 2-mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1200 UpM für 5 min bei 4°C pelletiert und anschließend in Lysepuffer 1 aufgenommen (300 µl für eine 145 cm² Schale). Nach Inkubation für 20 min auf Eis wurde wieder bei 1200 UpM zentrifugiert. Der Überstand enthält die löslichen Proteine des Cytoplasmas und einen Teil des Nukleoplasmas, das Pellet die Zellkerne. Das Pellet wurde in Lysepuffer 2 aufgenommen, auf Eis für 10 min inkubiert und in 15 ml-Falcons zu je 1 ml aliquotiert. Anschließend erfolgte das Scheren der DNA durch mechanische Zerkleinerung mit dem Sonifikator für 80 x 1 Sekunde bei 25 - 30 % Amplitude. Das Falcon wurde währenddessen in einem Eis-Wassergemisch gekühlt. Die Chromatinaliquots wurden vereinigt und das Chromatin über Nacht auf Eis aufbewahrt.

Bestimmung der Chromatinmenge und Quantifizierung: Von jeder Bedingung wurde ein 50 µl Aliquot Chromatin abgenommen und das *Crosslinking* revertiert. Das Chromatin wurde dazu mit 20 µg RNase A und 20 µg Proteinase K versetzt und 3 Stunden bei 55 °C und über Nacht bei 65°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 µl des Chromatins mittels Gelelektrophorese mit einem 1 % Agarosegel aufgetrennt um die Fragmentierung des Chromatins unter dem UV Schirm zu überprüfen. Die Größe sollte 200 - 1000 bp betragen.

Die verbleibenden 40 µl wurden für eine Aufreinigung mittels Qiaquick PCR Purification Kit verwendet, um die DNA-Konzentration der Proben zu bestimmen.

Absättigen der Protein-A/G-Sepharose: Die benötigte Gesamtmenge an Sepharose wurde wie folgt berechnet: $20\ \mu\text{l} \times \text{IP} \times 2 \times \text{B} + 30\ \mu\text{l} \times \text{IP} \times \text{B}$. (B für Bedingung, IP für Immunpräzipitation) Die Sepharose wurde in 10 ml Lysepuffer 2 aufgenommen und mit 1 mg/ml BSA und 400 µg/ml Lachssperma DNA über Nacht auf dem Rad bei 4°C abgesättigt. Dann wurde sie Sepharose pelletiert und mit 10 ml Lysepuffer 2 gewaschen.

Preclearing 1 des Chromatins: Das Chromatin wurde mit der abgesättigten Sepharose ($20\ \mu\text{l} \times \text{IP} \times \text{B}$) versetzt und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sepharose bei 3000 UpM für 5 min pelletiert und das Chromatin in ein neues Falcon überführt.

Absättigen der Protein-A/G-Sepharose mit Kontrollantikörpern: Während des *Preclearings* 1 wurden $20\ \mu\text{l} \times \text{IP} \times \text{B}$ der geblockten Protein-A/G-Sepharose mit 500 µl IPH aufgefüllt und mit 1 µg Kaninchen oder Maus IgG pro IP versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei 4°C wurde der Ansatz 3-mal mit 10 ml Lysepuffer 2 gewaschen.

Preclearing 2 des Chromatins: Das Chromatin wurde mit der IgG-gesättigten Sepharose versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei 4°C konnte die Sepharose bei 3000 UpM abzentrifugiert und das Chromatin für die Immunpräzipitation verwendet werden.

Immunpräzipitation (IP): Das Chromatin konnte nach dem zweiten *Preclearing* in der Immunpräzipitation eingesetzt werden. Das Chromatin wurde gleichmäßig auf Eppendorfgefäße verteilt und die Antikörper dazu pipettiert. Zuvor wurden pro Bedingung 2-mal 1% der Inputmenge des Chromatins abgenommen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Rad. Am nächsten Tag wurde die Sepharose (30 µl pro IP) in die Ansätze gegeben und nach 2 Stunden Inkubation bei 4°C bei 3000 UpM zentrifugiert. Es folgten mehrere Waschriffe mit je einem 1 ml Waschpuffer:

2 x Waschpuffer 1

2 x Waschpuffer 2

4 x Waschpuffer 3

2 x TE pH 8,0

Elution und Reversion: Das Sepharose-Pellet wurde dann in 250 µl frischen Elutionspuffer aufgenommen und 15 min bei RT rotiert. Nach Zentrifugation der Sepharose wurden die Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Elution wurde noch einmal wiederholt.

Die Inputs wurden ebenfalls mit 500 µl Elutionspuffer versetzt. Jede Probe wurde für das *Decrosslinking* mit 52 µl frisch angesetzter Reversionspuffer versetzt, diese für 3 Stunden bei 55°C und dann über Nacht bei 65°C inkubiert.

Aufreinigung: Die DNA wurde mit dem Qiaquick PCR Purification Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 50 µl EB Puffer. Die ChIP-DNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

PCR: Die ChIP wurde mittels qPCR ausgewertet (siehe 4.1.15). Es wurden 0,6 - 0,8 µl DNA pro PCR eingesetzt.

4.4.25. Affinitätsaufreinigung von Antikörpern

Diese Methode dient der Aufreinigung polyklonaler Antikörperseren. Dabei wird Antigenprotein an einer Membran immobilisiert und mit Antikörperserum inkubiert. So werden spezifisch die Antikörper an die Membran gebunden, die das Antigen erkennen und so von restlichen Serumproteinen abgetrennt.

Material	Zusammensetzung
TBS	50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl
TBS/Tween	TBS; 0,5 % (v/v) Tween 20
BSA-Lösung	3 % (w/v) BSA in TBS
Elutionspuffer	50 mM Glycin; pH 2,5 mit HCl

Das Antigen, das für die Bindung des Antikörpers verwendet werden sollte, wurde als rekombinantes Protein aus Bakterien aufgereinigt (4.4.15 und 4.4.16). Ca. 0,5 - 1 mg des Proteins wurden mit einem 1,5 mm dicken SDS-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose geblottet (4.4.6, 4.4.10). Die Proteine auf der Membran wurden durch eine Ponceau S-Färbung angefärbt und die entsprechenden Proteinbanden ausgeschnitten. Um schwach gebundene Proteine von der Membran zu lösen, wurde die Membran bei RT für 5 min mit Elutionspuffer und anschließend 2-mal für 2 min mit TBS gewaschen. Die Membran wurde mit BSA-Lösung für 2 Stunden bei RT abgesättigt. Das Antikörperserum wurde 1:5 in TBS verdünnt und bei 4°C über Nacht mit der Membran inkubiert. Die Serumverdünnung wurde abgenommen und für einen zweiten Aufreinigungsschritt aufbewahrt. Die Membran wurde 3-mal für 5 min bei RT mit TBS/Tween und 2-mal mit PBS gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte durch 2-malige Inkubation der Membran mit Elutionspuffer für 10 min bei RT inkubiert unter gelegentlichem

vortexen. Zur Neutralisation des pH-Wertes wurden den Eluaten sofort 30 mM Tris pH 9,5 hinzugefügt. Die vereinigten Antikörpereluaten wurden außerdem mit 10% (v/v) Glycerol und 0,02% (w/v) Natriumazid versetzt, bevor diese bei -80°C gelagert wurden.

5. Ergebnisse

5.1. Analyse der transkriptionellen Kooperation von PRMT1 und PRMT4 in der STAT5-vermittelten Genexpression

PRMT1 und PRMT4 sind in der Literatur als individuelle Coaktivatoren für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren beschrieben. Außerdem gibt es einige Befunde die belegen, dass beide PRMTs in der Aktivierung der Transkription zusammenwirken. So konnte eine kooperative Verstärkung der Transkription für nukleäre Hormonrezeptoren, p53 und für NFκB gezeigt werden (Koh et al. 2001; Lee et al. 2002; An et al. 2004; Hassa et al. 2008).

Die Rolle von PRMT1 und PRMT4 in der Genexpression und ihre Kooperativität wurde in der Dissertation von Markus Kleinschmidt (AG Bauer, 2006) mit einer globalen Genexpressionsanalyse untersucht. Ziel war es dabei neue Zielgene von PRMT1 und PRMT4 zu identifizieren und damit bisher unbekannte Funktionen der PRMTs in zellulären Signalwegen aufzudecken. Dafür wurden PRMT1 und PRMT4 jeweils einzeln und zusammen mittels siRNA in HeLa-Zellen depletiert. Die Analyse des Genexpressionsprofils mittels eines humanen 11552 cDNA-Chips ergab keine Änderung der Genexpression der Einzelknockdowns im Vergleich zum Wildtyp. Eine signifikante Änderung in der Genexpression wurde jedoch nach Depletion beider PRMTs (Doppelknockdown) beobachtet. Mehr als 46 Gene waren mehr als 2-fach dereguliert. Diese Resultate wurden durch quantitative PCR der cDNA der *knockdown*-Bedingungen verifiziert. Die Promotoren der durch PRMT1 und PRMT4 deregulierten Gene wurden hinsichtlich ihrer *cis*-regulatorischen Elemente untersucht. Diese Analyse identifizierte Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren STAT5 und STAT6 in einigen der durch PRMT1 und PRMT4 aktivierten Gene. Darunter befanden sich die Gene CITED2 (*Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2*) und KRT8 (Keratin 8).

Im Rahmen der Arbeit von Markus Kleinschmidt wurden neue, putative Zielgene der kooperativen Coaktivierung durch PRMT1 und PRMT4 identifiziert und eine Anreicherung von STAT5- und STAT6-Bindestellen in diesen Genen gefunden. In einem unabhängigen Reporter-gen-Assay konnte gezeigt werden, dass STAT5 durch PRMT1 und PRMT4 kooperativ coaktiviert wird. In der hier vorgelegten Arbeit sollte nun weiterführend untersucht werden, ob CITED2 und KRT8 nach einem Cytokinstimulus in ihrer Genexpression tatsächlich STAT5- und STAT6-abhängig aktiviert werden und ob PRMT1 und PRMT4 dabei als direkte oder indirekte transkriptionelle Coaktivatoren der Genexpression wirken.

5.1.1. Die PRMT1/PRMT4-regulierten Zielgene CITED2 und KRT8 werden durch IL-4 induziert

Zunächst wurde die Induzierbarkeit der im *Doppelknockdown* von PRMT1 und PRMT4 deregulierten Gene CITED2 und KRT8 durch Aktivierung des STAT5- und STAT6-Signalweges überprüft. Das Cytokin IL-4 aktiviert in B-Zellen STAT3, STAT5 und STAT6 (Rolling et al. 1996). In HeLa-Zellen wurde bereits gezeigt, dass IL-4 der kanonische Stimulus für STAT6 ist und die STAT6-abhängige Genexpression stimuliert (Kaminski et al.; Levy and Darnell 2002). Aus T-Lymphozyten ist außerdem bekannt, dass IL-4 den STAT5-abhängigen Signalweg induziert (Lischke et al. 1998). Nach der Bindung des Cytokins IL-4 an seinen Cytokinrezeptor phosphoryliert eine rezeptorassoziierte Kinase (JAK) bestimmte Tyrosinreste von STAT5 und STAT6. Dies ermöglicht eine Dimerisierung der STAT-Proteine, was zu ihrer Freisetzung von den Cytokinrezeptoren führt. Die STAT-Dimere werden durch Importine in den Zellkern lokalisiert, binden dort an spezifische DNA-Bindestellen und aktivieren die Transkription ihrer Zielgene.

Die Aktivierung des STAT5- und STAT6-Signalweges durch IL-4 in HeLa-Zellen wurde durch den Nachweis der Tyrosinphosphorylierung der Transkriptionsfaktoren untersucht. HeLa-Zellen wurden mit IL-4 stimuliert und dann direkt in SDS-Lysepuffer aufgenommen, um eine Dephosphorylierung zu verhindern. Die Western Blot-Färbung in Abb. 8 A zeigt die Phosphorylierung beider Transkriptionsfaktoren nach einem IL-4-Stimulus. Die Proteinmengen von STAT5 und STAT6 blieben während des IL-4-Stimulus unverändert. Folglich konnte der STAT5- und STAT6-Signalweg in HeLa-Zellen durch IL-4 aktiviert werden. Die Transkriptmengen von CITED2 und KRT8 vor und nach dem IL-4-Stimulus wurden in Abb. 8 B mittels RT-qPCR bestimmt. Damit konnte gezeigt werden, dass die Gene KRT8 und CITED2 in HeLa-Zellen durch das Cytokin IL-4 etwa 1,8-fach transkriptionell induziert wurden (Abb. 8 B).

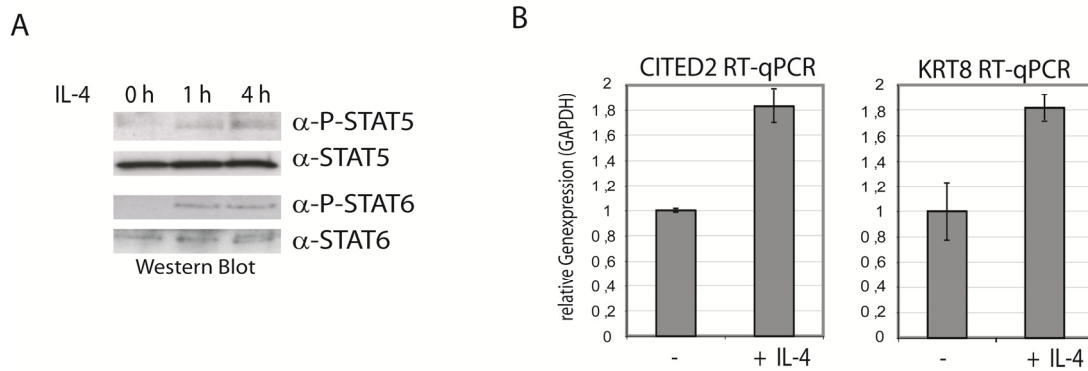


Abb. 8 Induktion von CITED2 und KRT8 durch IL-4 in HeLa-Zellen

A. HeLa Zellen wurden mit 20 ng/ml Interleukin für 0, 1 und 4 h behandelt und dann in 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und die Extrakte 10 Sekunden sonifiziert. 50 µl der Proben wurden im Western Blot mit den genannten Antikörpern analysiert. Der Antikörper gegen Phospho-STAT5A/B ist gegen phosphoryliertes Tyr 694/699 gerichtet. Der gegen Phospho-STAT6 gerichtete Antikörper erkennt phosphoryliertes Tyrosin 641 von STAT6. **B.** HeLa-Zellen wurden nicht behandelt (-) oder mit IL-4 für 16 h behandelt (+) und für die RNA-Präparation geerntet. Die Transkriptmenge für hCITED2 und hKRT8 bezogen auf GAPDH wurden mit RT-qPCR bestimmt.

5.1.2. STAT5, PRMT1 und PRMT4 sind essentiell für die IL-4-abhängige Transkription von CITED2

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die Transkriptionsfaktoren STAT5 und STAT6 sowie die beiden PRMTs für die IL-4-vermittelte Induktion der Gene CITED2 und KRT8 notwendig sind. HeLa-Zellen wurden mit siRNA gegen STAT5, STAT6 und beide PRMTs transfiziert und nach 24 Stunden mit IL-4 behandelt. Die siRNA gegen STAT5 wurde so gewählt, dass sie die Depletion beider für STAT5 kodierenden Gene STAT5A und STAT5B bewirkt (Paukku and Silvennoinen 2004). Die Depletion der Transkriptionsfaktoren STAT5 und STAT6 wurde im Western Blot auf Proteinebene überprüft (Abb. 9 A). Im Vergleich zur Ladekontrolle β -Tubulin war eine spezifische Depletion von STAT5 und STAT6 erfolgt. Der erfolgreiche *knockdown* von PRMT1/PRMT4 wurde mit RT-qPCR nachgewiesen (Abb. 9 B). In Abb. 9 C wurde die Genexpression von CITED2 und KRT8 im Doppel*knockdown* von PRMT1 und PRMT4, und im *knockdown* von STAT5 oder STAT6 vor und nach IL-4-Stimulation untersucht. In unbehandelten Zellen führte eine Codepletion von PRMT1 und PRMT4 im Vergleich zur Kontrolle siNON zu verringerten Transkriptmengen von CITED2 und KRT8 in der RT-qPCR. Dieses Resultat entspricht dem Befund in der Microarrayanalyse (Dissertation Markus Kleinschmidt, 2006). Hingegen hatte die Depletion von STAT5 oder STAT6 im uninduzierten Zustand keinen Einfluss auf die Expression von CITED2 und KRT8 (Abb. 9 C). Desweiteren war zu beobachten, dass die Codepletion von PRMT1 und PRMT4 bzw. die Depletion von STAT5 keine Auswirkung auf die IL-4-vermittelte transkriptionelle Induktion

von KRT8 hatte. Jedoch führte die Depletion von STAT6 zu einem Verlust der IL-4-vermittelten transkriptionellen Aktivierung von KRT8 (Abb. 9 C). Die beobachtete transkriptionelle Aktivierung von KRT8 nach dem IL-4-Stimulus war daher unabhängig von PRMT1 und PRMT4 bzw. STAT5, könnte jedoch STAT6 vermittelt sein. Im Falle des CITED2-Gens verhinderte die Codepletion von PRMT1 und PRMT4 bzw. die Depletion von STAT5 vollständig eine Aktivierung der Genexpression durch den IL-4-Stimulus (Abb. 9 C). Da die Depletion von STAT6 jedoch zu einer geringeren Expression der beiden Coaktivatoren PRMT1 und PRMT4 führte, könnte es sich hierbei um eine indirekte Regulation von CITED2 durch STAT6 handeln (Abb. 9 B).

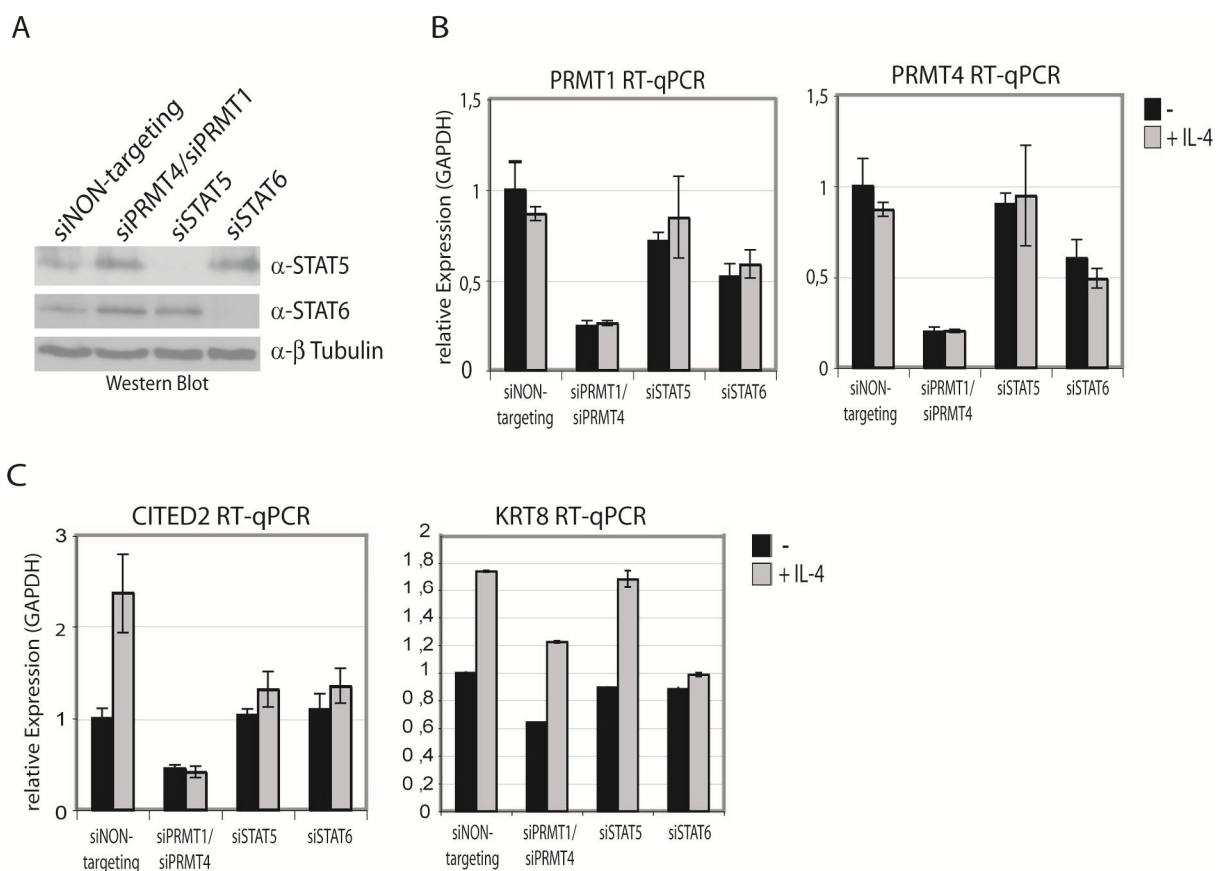


Abb. 9 Induzierbarkeit von CITED2 und KRT8 in Abhängigkeit von PRMT1, PRMT4 und STAT5

A. HeLa-Zellen wurden in 6 cm-Schalen mit je 80 nM siNON, siPRMT1/siPRMT4, siSTAT5 und siSTAT6 transfiziert und nach 48 h mit SDS-Lysepuffer geerntet. Die Extrakte wurden 10 Sekunden sonifiziert und 50 µl in der Western Blot-Färbung mit Antikörpern gegen STAT5, STAT6 und β-Tubulin analysiert. **B, C.** HeLa-Zellen wurden für 24 h mit siNON, siPRMT1/siPRMT4, siSTAT5 und siSTAT6 transfiziert. Die Zellen wurden dann unbehandelt gelassen (schwarze Balken) oder mit 20 ng/ml IL-4 für 24 h stimuliert (graue Balken). Die Gesamt-RNA wurde mit RT-qPCR hinsichtlich der Transkriptmengen von PRMT1, PRMT4 (**B.**), CITED2 und KRT8 (**C.**) bezogen auf GAPDH analysiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass der Transkriptionsfaktor STAT5 und die Coaktivatoren PRMT1 und PRMT4 notwendig für die IL-4-vermittelte Induktion des CITED2-Gens sind. Da STAT6 die

Expression von PRMT1 und PRMT4 beeinflusste, wurde der STAT6-Signalweg in den folgenden Experimenten nicht weiter untersucht. KRT8 konnte zwar durch IL-4 transkriptionell induziert werden, jedoch war diese transkriptionelle Induktion unabhängig von PRMT1 und PRMT4 bzw. STAT5.

5.1.3. CITED2 ist ein direktes Zielgen von STAT5, PRMT1 und PRMT4

PRMT1 und PRMT4 wirken als direkte Coaktivatoren, indem sie an die Promotoren ihrer Zielgene rekrutiert werden. Dies wurde zum Beispiel für PRMT4 in der estrogenabhängigen Induktion des pS2-Gens beschrieben (Bauer et al. 2002). Desweiteren wurde die Rekrutierung von PRMT1 und PRMT4 durch den Transkriptionsfaktor p53 an das GADD45-Gen nachgewiesen (An et al. 2004).

Um eine mögliche Rolle der PRMTs als direkte Coaktivatoren für den Transkriptionsfaktor STAT5 zu untersuchen, sollte nun ihre Rekrutierung an das CITED2-Gen durch Chromatinimmunpräzipitation untersucht werden. Die Zunahme der relativen Transkriptmenge von CITED2 nach dem IL-4-Stimulus fiel mit 1,8-fach relativ gering aus. Um eine induzierte Rekrutierung der PRMTs und von STAT5 in der ChIP detektierbar zu machen, wurde zunächst versucht, die transkriptionelle Induktion des CITED2-Gens zu verstärken. Da in Abb. 9 C unter normalen Wachstumsbedingungen mit 10 % FCS ein *knockdown* von PRMT1 und PRMT4 zu einem Verlust der CITED2-Genexpression führte, lag CITED2 also unter herkömmlichen Zellkulturbedingungen schon induziert vor. Die Analyse der CITED2-Genexpression von gehungerten im Vergleich zu in 10 % FCS gewachsenen HeLa-Zellen machte deutlich, dass CITED2 durch die Zugabe von 10 % FCS transkriptionell induziert wird (Abb. 10 A). Die transkriptionelle Induzierbarkeit von CITED2 durch IL-4 war in gehungerten und in 10 % FCS-gewachsenen HeLa-Zellen gleichermaßen möglich (Abb. 10 A). Eine Kombination des Stimulus mit 10 % FCS und IL-4 (FCS/IL-4) bewirkte eine verstärkte Transkription des CITED2-Gens. Gegenüber den Wachstumsbedingungen ohne FCS führte der FCS/IL-4-Stimulus zu einer über 4-fachen Induktion von CITED2 (Abb. 10 A).

Die Rekrutierung der Faktoren PRMT1, PRMT4 und STAT5 an die STAT5-Bindestelle des CITED2-Promotors wurde nun mittels ChIP von gehungerten und mit FCS/IL-4-stimulierten HeLa-Zellen analysiert (Abb. 10 C). Der Transkriptionsfaktor STAT5 war vor und nach der Stimulation mit FCS/IL-4 im Bezug zur IgG-Kontrolle 2-fach an den CITED2-Promotor rekrutiert (Abb. 10 C). Eine verstärkte STAT5-Bindung nach 16 Stunden Induktion mit FCS/IL-

4 war nicht zu beobachten. Die Coaktivatoren PRMT1 und PRMT4 waren im uninduzierten Zustand nicht an den Promotor gebunden, wurden jedoch nach Stimulation mit FCS/IL-4 an den CITED2 Promotor rekrutiert. Eine Rekrutierung von STAT5 und den PRMTs an eine 6 kbp stromaufwärts vom CITED2-Gen gelegene Kontrollregion war nicht detektierbar.

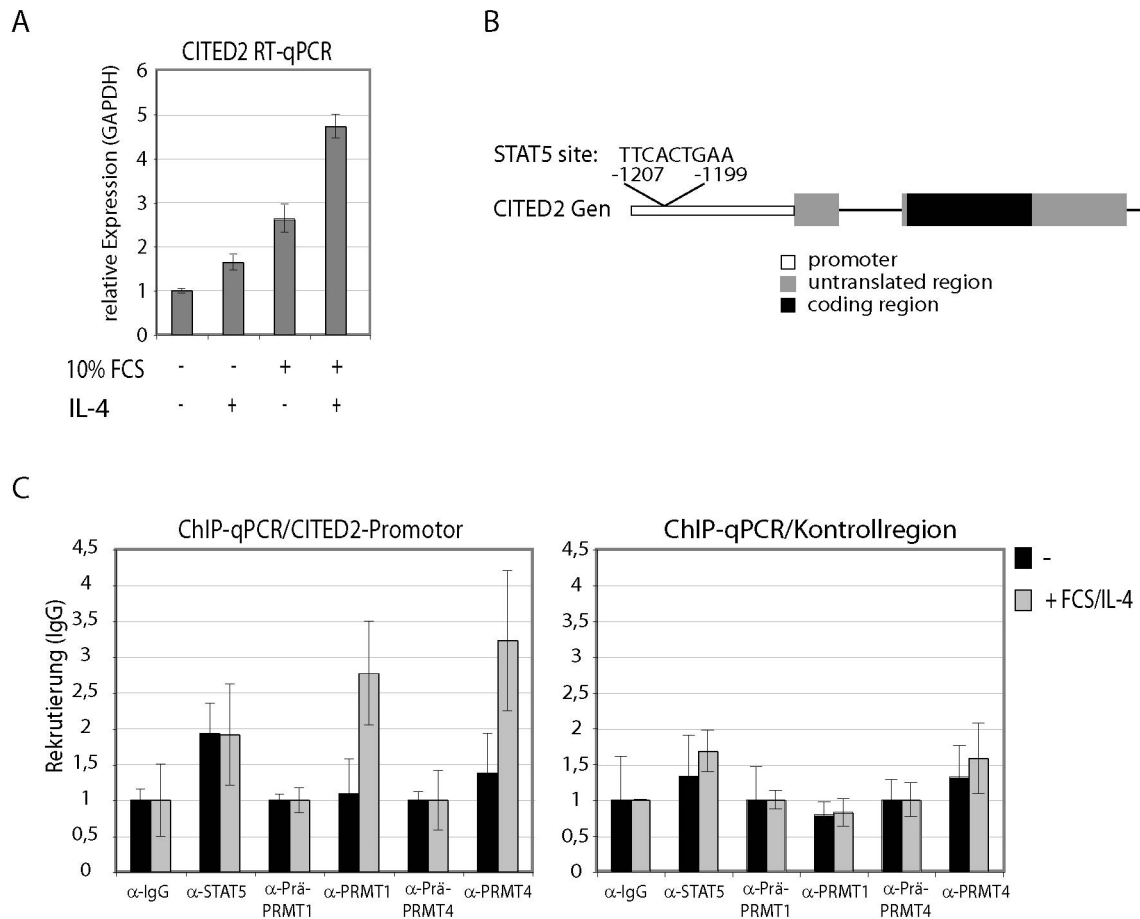


Abb. 10 Chromatinimmunpräzipitation von STAT5, PRMT1 und PRMT4 am CITED2-Gen

A. Gehungerte HeLa-Zellen (0,1 % FCS) wurden mit 20 ng/ml IL-4 und 10 % FCS einzeln und in Kombination für 16 h behandelt. Aus diesen Zellen wurde RNA präpariert und die Transkriptmengen von CITED2 relativ zu GAPDH mit RT-qPCR analysiert. **B.** Schematische Darstellung des CITED2-Gens mit potentieller STAT5-Bindestelle. **C.** HeLa-Zellen wurden gehungert (schwarze Balken) oder mit 10 % FCS und 20 ng/ml IL-4 für 16 h behandelt (graue Balken) und dann für die Chromatinimmunpräzipitation geerntet. In der ChIP wurden Antikörper gegen STAT5, und Seren gegen PRMT4 und PRMT1, sowie die Kontrollantikörper Kaninchen IgG und Präimmunsereen verwendet. Die Auswertung der immunpräzipitierten DNA erfolgte mittels qPCR in Triplikaten. Die verwendeten Primer für den Promotor des CITED2-Gens umspannen die potentielle STAT5-Bindestelle, die Primer für die Kontrollregion binden 6 kbp stromaufwärts vom CITED2-Gen. Die Rekrutierung wurde auf IgG oder auf die jeweiligen Präimmunsereen bezogen.

Um die Rekrutierung von STAT5 und der beiden PRMTs an den CITED2-Promotor genauer zu charakterisieren, wurde ein Zeitverlauf von 0, 2, 8 und 16 Stunden Stimulation mit FCS/IL-4 in der ChIP untersucht. Aus Abb. 11 geht hervor, dass STAT5 und PRMT4 in einem

transienten Verlauf an den CITED2-Promotor rekrutiert wurden. Das Maximum für die Rekrutierung wurde nach 8 Stunden detektiert. STAT5 lag also nicht konstitutiv mit dem CITED2-Promotor assoziiert vor, sondern war nach 16 Stunden bereits vom Promotor dissoziiert. PRMT1 wurde ebenfalls stimulusabhängig an den Promotor rekrutiert, blieb jedoch auch nach 16 Stunden assoziiert.

Die Funktion von PRMT1 und PRMT4 als Coaktivatoren geht mit der asymmetrischen Dimethylierung von Histonen einher. Dabei methyliert PRMT1 Histon H4 am Arginin 3 und PRMT4 Histon H3 am Arginin 17 (Wang 2001; Bauer 2002). Um zu untersuchen, ob die katalytische Aktivität der beiden PRMTs bei der Induktion des CITED2-Gens eine Rolle spielt, wurde das Auftreten der Histonmodifikationen in der ChIP-Analyse überprüft (Abb. 11). Nach Induktion mit FCS/IL-4 wurde die Promotorregion des CITED2 Promotors transient am H4R3 und H3R17 dimethyliert. Die Rekrutierung war nach 8 Stunden am stärksten und ging nach 16 Stunden nahezu vollständig auf die ursprüngliche Signalstärke zurück.

Die durchgeführten ChIP-Analysen zeigten, dass CITED2 ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors STAT5 und der Coaktivatoren PRMT1 und PRMT4 ist. Da die transkriptionelle Induktion des CITED2-Gens durch IL-4 mit der PRMT1- und PRMT4-vermittelten Argininmethylierung von Histonen einhergeht, ist die katalytische Aktivität beider PRMTs für die transkriptionelle Aktivierung von CITED2 vermutlich wichtig.

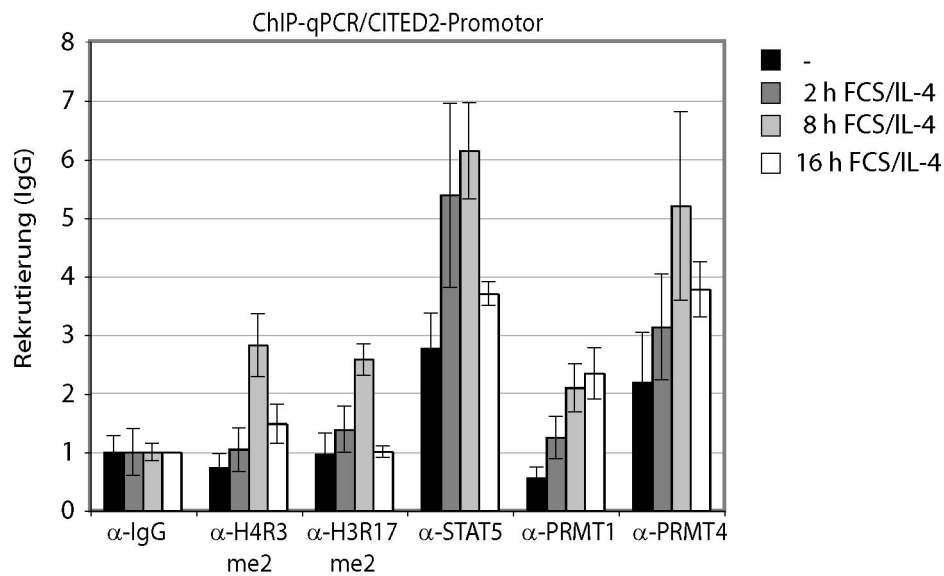


Abb. 11 Zeitverlauf der Methylierung von H3R17 und H4R3 und der Rekrutierung von STAT5 und der PRMTs

HeLa-Zellen wurden mit 0,1 % FCS in DMEM gehungert und dann mit 10 % FCS und 20 ng/ml IL-4 für 2, 8 und 16 h behandelt. Die Zellen wurden für die Chromatinimmunpräzipitation geerntet. In der ChIP wurden Antikörper gegen STAT5, die Histonmodifikation H4R3me2 und H3R17me2, affinitätsaufgereinigte Antikörper gegen PRMT4 und PRMT1, sowie Kontrollantikörper aus Kaninchen IgG verwendet. Die Auswertung der immunpräzipitierten DNA erfolgte mittels qPCR in Triplikaten. Die verwendeten Primer für den Promotor des CITED2-Gens umspannen die potentielle STAT5-Bindestelle. Die Rekrutierung wurde auf IgG bezogen.

5.1.4. PRMT1 und PRMT4 interagieren cytokinabhängig mit STAT5 *in vitro* und *in vivo*

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass STAT5, PRMT1 und PRMT4 eine Rolle bei der transkriptionellen Induktion des CITED2-Gens spielen und an den Promotor des Zielgens rekrutiert werden. Der Transkriptionsfaktor STAT5 könnte dabei die Rekrutierung der PRMTs an den CITED2-Promotor vermitteln, indem dieser mit den PRMTs interagiert. Die Frage, ob nach Cytokininduktion eine Interaktion zwischen STAT5 und den beiden PRMTs stattfindet, wurde durch GST-Pulldowns und Coimmunpräzipitationen beantwortet.

Für den Pulldown wurden die rekombinanten Proteine GST (28 kDa), GST-PRMT1 (68 kDa) und GST-PRMT4 (93 kDa) aus *E.coli* BL21 DE3 aufgereinigt und die Proteinmengen in einem Coomassiegelel abgeglichen (Abb. 12 A). Die mit einem Stern gekennzeichneten GST-PRMTs in voller Länge lagen in geringeren Mengen vor als das GST-Protein, das als Kontrolle diente. Bei den Banden, die unter dem Molekulargewicht der PRMTs in voller Länge im SDS-Gel liefen, handelte es sich um Abbau. Die Bindung von exogenem STAT5B an die GST-Proteine vor und nach einem IL-4-Stimulus wurde nun im GST-Pulldown untersucht. Die Western Blot-

Analyse zeigte anhand des Inputs eine gleichmäßige Expression von STAT5B in HeLa-Zellen unter beiden Bedingungen (Abb. 12 A). Nach Induktion mit IL-4 konnte eine verstärkte Interaktion von STAT5B mit GST-PRMT1 und GST-PRMT4 detektiert werden (Abb. 12 A). Das GST-Kontrollprotein war nicht in der Lage STAT5B aus dem Extrakt zu binden.

Dieses Resultat sollte mittels Coimmunpräzipitation unter Verwendung eines Antikörpers gegen PRMT1 und PRMT4 verifiziert werden (Abb. 12 B). Die Inputfärbung in Abb. 12 B zeigte eine gleichmäßige Expression der Proteine PRMT1, PRMT4 und STAT5 während der IL-4-Induktion von HeLa-Zellen. Aus der Western Blot-Analyse der CoIP ging hervor, dass mit Antikörpern gegen PRMT1 und PRMT4 nach Stimulation mit IL-4 im Vergleich zum Kontrollantikörper endogenes STAT5 copräzipitiert werden konnte. Im Falle der PRMT4-IP war eine schwache Interaktion mit STAT5 schon im uninduzierten Zustand zu erkennen, diese wurde durch eine Stunde Inkubation mit IL-4 deutlich verstärkt. Die IL-4-vermittelte Interaktion zwischen PRMT1 und STAT5 war nach 16 Stunden am stärksten. Die Immunfärbung von PRMT1 und PRMT4 zeigte eine einheitliche Anreicherung von PRMT1 und PRMT4 in den IPs der untersuchten Bedingungen (Abb. 12 B).

Anhand dieser Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass PRMT1 und PRMT4 in Abhängigkeit von IL-4 mit STAT5 interagieren. Zusammen mit den Resultaten aus der ChIP-Analyse legen diese Ergebnisse nahe, dass beide PRMTs durch den Transkriptionsfaktor STAT5 an den CITED2-Promotor rekrutiert werden, um dort die Transkription von CITED2 zu verstärken.

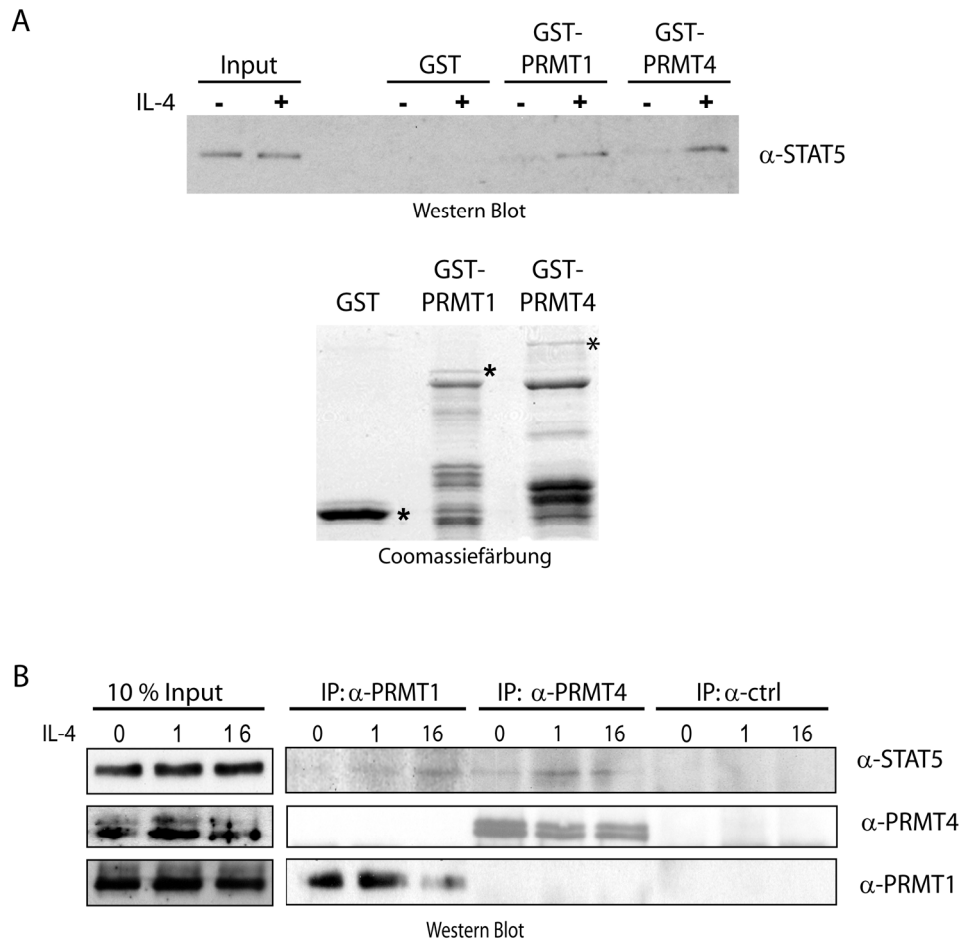


Abb. 12 Interaktion von STAT5 mit PRMT1 und PRMT4

A. HeLa-Zellen wurden mit pECE-STAT5B (10 μ g pro 14 cm-Schale) mittels Calciumphosphat-Transfektion transfiziert und nicht behandelt (-) oder für 16 Stunden mit IL-4 behandelt (+). Die Zellen wurden in IPH-Puffer (mit Phosphataseinhibitoren) lysiert. An Glutathion-Sepharose gebundenes GST (1 μ g), GST-PRMT1 und GST-PRMT4 wurden in einem Coomassiegelel abgeglichen (mit Stern gekennzeichnet) und mit 250 μ g IPH-Lysat für 2 h bei 4°C inkubiert. Die an die Glutathion-Sepharose gebundenen Proteine wurden zusammen mit 2 % Input im Western Blot gegen STAT5 gefärbt. **B.** HeLa-Zellen wurden mit IL-4 für 0, 1 und 16 Stunden behandelt und geerntet. Die Präparation eines Kernextraktes erfolgte nach 3.4.3. Je 500 μ g Extrakt wurden mit 15 μ l α -PRMT1, 7,5 μ l α -PRMT4 und 0,75 μ g Kaninchen IgG ÜN inkubiert und die Antikörper-Proteinkomplexe mit ProteinA-Sepharose gebunden. Die präzipitierten Proteine wurden mit 10 % Input im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern gefärbt.

5.2. Identifikation neuer Interaktionspartner von PRMT4

Ein weiterer Ansatz die Funktionen von PRMTs zu untersuchen, stellt die Identifikation von neuen Interaktionspartnern dar. Für CBP und p160-Coaktivatoren ist gezeigt, dass diese indirekt bzw. direkt mit PRMT4 assoziieren. Diese Interaktionen sind für die Ausübung der Rolle von PRMT4 als transkriptioneller Regulator wichtig (Chen et al. 1999; An et al. 2004). Weiterhin ist bekannt, dass PRMT4 innerhalb eines estrogeninduzierten Multiproteinkomplexes vorliegt, der die Methylierung von Histon H3 durch PRMT4 reguliert (Xu et al. 2004). Diese Beispiele weisen darauf hin, dass die Funktion von PRMT4 durch die Interaktion mit einzelnen Proteinen oder innerhalb von Multiproteinkomplexen vermittelt wird. Um bisher unbekannte Interaktionspartner von PRMT4 zu identifizieren und damit neue Funktionsweisen von PRMT4 aufzudecken, sollten das Vorhandensein von PRMT4-haltigen Komplexe mittels Gelfiltrationsanalysen überprüft werden. Solche PRMT4-haltigen Komplexe sollten dann mit Hilfe chromatographischer Verfahren gereinigt werden.

5.2.1. PRMT4 bildet höhermolekulare Komplexe

Zunächst wurde die Komplexgröße von PRMT4 aus verschiedenen humanen Zelllinien mittels Gelfiltration bestimmt. Aus der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293, der Brustkrebszelllinie MCF7 und der T-Zell-Leukämiezelllinie Molt-4 wurden Gesamtzellextrakte generiert. Die Extrakte wurden mit Benzonase verdaut, um ein Aggregieren der Proteine mit DNA und somit eine Elution im Ausschlussvolumen (v_0) der Säule zu verhindern. Die Gelfiltration mit einer Superose 6-Säule ermöglichte eine breite Auftrennung der Proteine in einem Größenbereich von 5 bis 5 000 kDa. Der Abgleich mit den Elutionsprofilen von Eichproteinen erlaubte eine Abschätzung der Komplexgröße. Während der Gelfiltration wurden 1ml-Fractionen gesammelt und diese mittels Western Blot analysiert. Aus dem Elutionsprofil geht hervor, dass PRMT4 in allen getesteten Zelllinien in den Fractionen 14 und 15 mit einem Größenbereich von etwa 100 bis 500 kDa vorlag (Abb. 13). Außerdem konnte PRMT4 in HEK293- und schwächer in Molt-4-Zellen zusätzlich in Fraction 13 detektiert werden, also in einem Größenbereich, der größer war als 500 kDa. Im Profil der MCF7-Zellen war das Elutionsmaximum bei Fraction 15, und damit im Vergleich zu Molt-4 und HEK293 um eine Fraction zu einer kleineren Komplexgröße hin verschoben. Im Gegensatz zu HEK293- und Molt-4-Zellen, konnte PRMT4 in MCF7-Zellen schwach im monomeren Bereich von 63 kDa in der Gelfiltration detektiert werden. Anhand der PRMT4-Färbung sind außerdem unterschiedliche Laufhöhen der PRMT4-Banden im SDS-Gel zu

erkennen (Abb. 13). Dies kann vermutlich auf das Vorhandensein unterschiedlicher Isoformen von PRMT4 in den verschiedenen Zelllinien zurückgeführt werden (Ohkura et al. 2005).

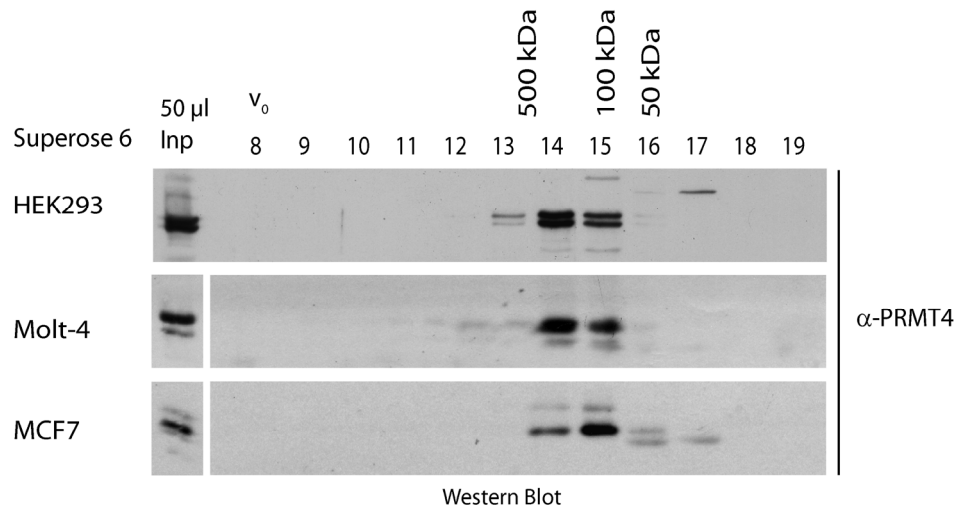


Abb. 13 Vergleich der Elutionsprofile von PRMT4 verschiedener Zelllinien

Gesamtzellextrakt aus HEK293, Molt-4 und MCF7-Zellen wurde mit Benzonase verdaut. 250 µg Protein wurden in 100 µl auf eine Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetragen. Es wurden 1 ml pro Fraktion gesammelt. Von jeder Fraktion wurden 500 µl mit Resin-Beads eingengt und zusammen mit dem Input auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen. In der Western Blot-Analyse wurde mit PRMT4-Rohserum gefärbt. V_0 ist das Ausschlussvolumen.

Um eine genauere Auftrennung im Größenbereich von kleineren Komplexen zu erhalten, wurden weitere Gelfiltrationen mit einer Superdex 200-Säule durchgeführt (Abb. 14). Die Superdex 200-Säule ermöglichte eine optimale Auftrennung im Größenbereich von 10 bis 600 kDa. Es wurden 1 ml- Fraktionen gesammelt und im Western Blot analysiert. Die Gelfiltration von HEK293- und HeLa-Zelllysaten zeigten, dass PRMT4 hauptsächlich in den Fraktionen 11 und 12 eluiert, die einer Größe von ca. 130 bis 400 kDa zugeordnet werden konnten. Wie zuvor in der Superose 6-Gelfiltration beobachtet wurde, lag in HEK293-Lysaten ein gewisser Anteil von PRMT4 mit einer Größe über 500 kDa vor. Da die PRMT4-Färbung in HeLa-Zellen schwächer ausfiel, lässt sich nicht schlussfolgern, ob auch hier ein geringer Anteil PRMT4 in einem größeren Komplex vorliegt (Abb. 14).

Die hier durchgeführten Gelfiltrationen führten zu dem Schluss, dass endogenes PRMT4 in verschiedenen Zelllinien überwiegend mit einer Komplexgröße von ca. 130 bis maximal 400 kDa vorlag. In HEK293-Zellextrakten konnte außerdem ein Anteil von PRMT4 in Komplexen detektiert werden, die größer als 500 kDa sind. Laut Literatur kann PRMT4 Homodimere bilden, die einer Größe von etwa 140 kDa entsprechen (Teyssier et al. 2002; Yue et al. 2007).

Daher ist anzunehmen, dass PRMT4 in den getesteten Zelllinien mit anderen Proteinen assoziiert als Komplex vorliegt.

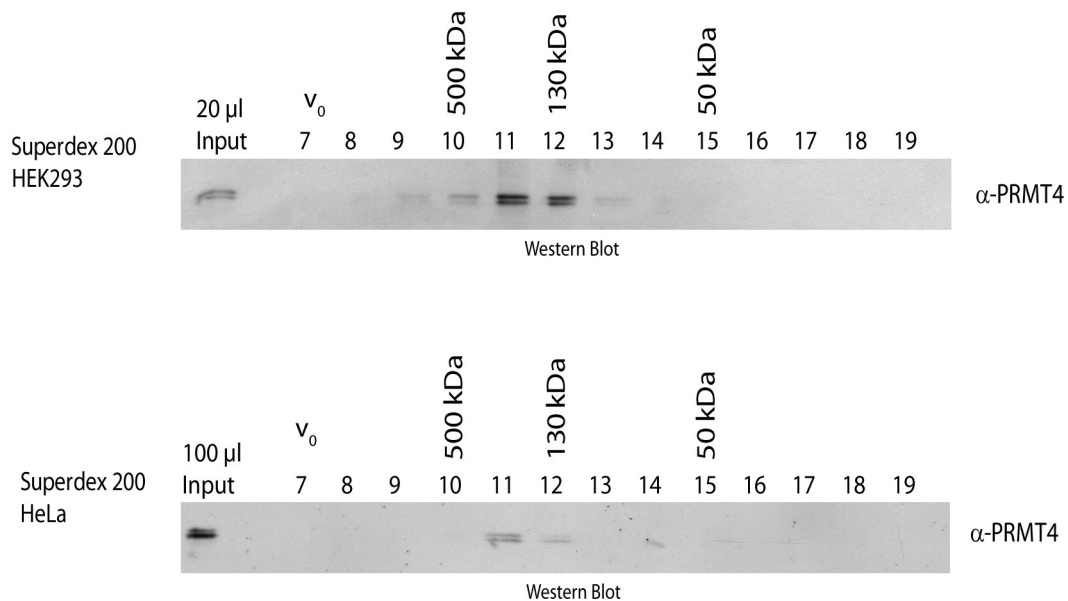


Abb. 14 Analyse der PRMT4-Komplexgröße mit einer Superdex 200-Säule

Gesamtzellextrakt aus HEK293 und HeLa-Zellen wurde mit Benzonase verdaut. 250 µg Protein wurden in 100 µl auf eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule aufgetragen. Es wurde 1 ml pro Fraktion gesammelt. Die Fraktionen wurden mit Resin-Beads eingengt und zusammen mit Input auf ein SDS-Gel aufgetragen. In der Western Blot-Analyse wurde nach PRMT4 gefärbt.

5.2.2. Vergleich der Komplexgröße von PRMT4 aus cytosolischen und nukleären Präparationen

Für PRMT4 ist sowohl eine cytosolische als auch eine nukleäre Lokalisation beschrieben (Herrmann et al. 2009). Es ergab sich daher die Fragestellung, ob die Komplexgröße von PRMT4 aus dem cytosolischen im Vergleich zum nukleären Kompartiment Unterschiede aufweist. Aus HEK293-Zellen wurde eine Extraktion nach Dignam angefertigt. Bei dieser Extraktionsmethode werden erst lösliche, cytosolische Proteine abgetrennt (CE). Die verbleibenden Zellkerne werden unter Hochsalzbedingungen extrahiert, um auch Chromatin assoziierte Proteine in Lösung zu bringen (NE). Die Extrakte wurden in der Gelfiltration mit einer Superdex 200-Säule hinsichtlich ihrer Komplexgrößen untersucht (Abb. 15). Es wurden 500 µl-Fractionen gesammelt und diese im Western Blot analysiert. Die Elutionsmaxima von PRMT4 aus cytosolischem und nukleärem Extrakt befanden sich in den Fraktionen 21, 22 und 23 bei einer Größe von 200 bis 400 kDa (Abb. 15). Dies weist darauf hin, dass PRMT4 sowohl im cytosolischen als auch im nukleären Kompartiment in ähnlich großen Komplexen vorliegt.

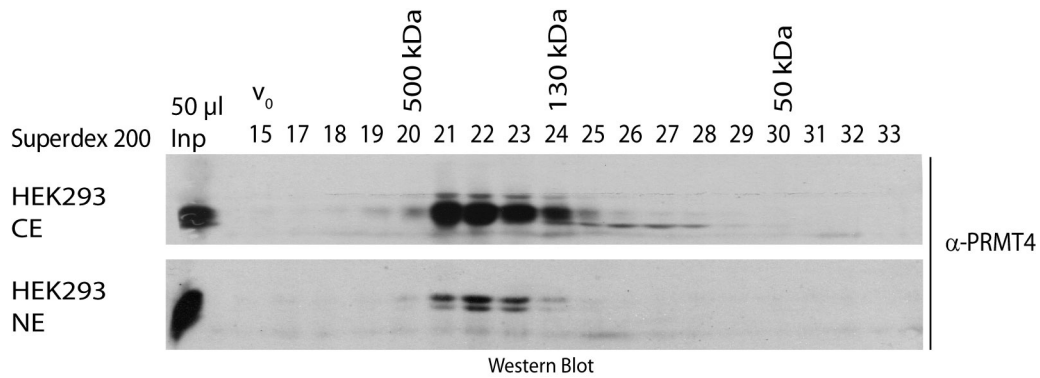


Abb. 15 Analyse der PRMT4-Komplexgröße in cytosolischen und nukleären Extrakten.

Aus HEK293-Zellen wurde ein cytosolischer (CE) und nukleärer Extrakt (NE) nach Dignam hergestellt und die Extrakte mit Benzonase verdaut. 250 µg Protein wurden in 100 µl auf eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule aufgetragen. Es wurden 500 µl-Fractionen gesammelt. Die vollständigen Fractionen wurden mit Resin-Beads eingeeengt und zusammen mit dem Input auf ein 7,5 %iges SDS-Gel aufgetragen. In der Western Blot-Analyse wurde nach PRMT4 gefärbt.

5.2.3. Chromatographische Aufreinigung PRMT4-haltiger Komplexe – Strategie und Analyse

Die Gelfiltrationsanalysen machten deutlich, dass PRMT4 vermutlich in Assoziation mit Interaktionspartnern vorliegt. Es sollte nun versucht werden, diese Interaktionspartner zu reinigen. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde in der Dissertation von Sabine Wagner (AG Bauer, Dissertation 2006) bereits eine chromatographische Aufreinigungsstrategie im analytischen Maßstab entwickelt. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit auf den präparativen Maßstab übertragen und weiterentwickelt (Abb. 16).

Der erste Aufreinigungsschritt erfolgte über Phosphocellulose, einem Kationenaustauscher mit immobilisierten Phosphatgruppen. Die Generierung der Extrakte aus HEK293-Suspensionszellen sowie die Phosphocelluloseläufe wurden durch die Arbeitsgruppe Müller durchgeführt. Große Mengen der PRMT4-haltigen Durchbruchfraktion PCA wurden uns zur Verfügung gestellt (Abb. 16).

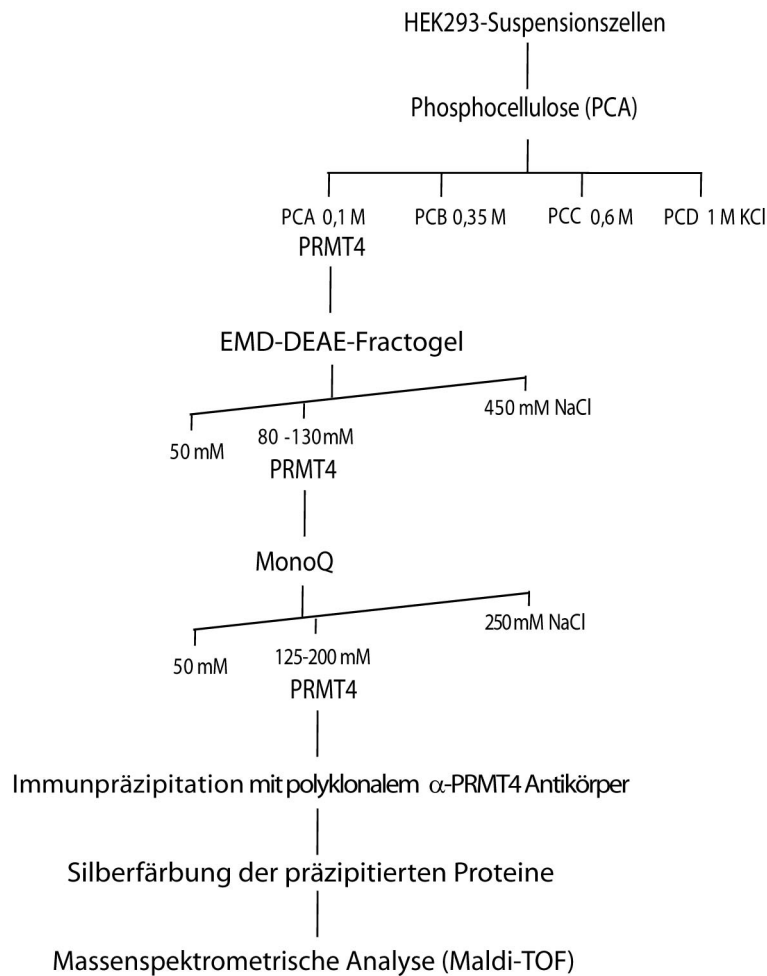


Abb. 16 Aufreinigungstrategie PRMT4-haltiger Komplexe

Der erste Aufreinigungsschritt erfolgte über den Kationenaustauscher Phosphocellulose, gefolgt von einer Anionenaustauscher-Chromatographie über EMD-DEAE-Fractogel und einem stärkeren Anionenaustauscher MonoQ. Aus den mit PRMT4 angereicherten Fraktionen wurde PRMT4 immunpräzipitiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das SDS-Gel wurde einer Silberfärbung unterzogen um daraus gefärbte, copräzipitierte Banden auszuschneiden und in der massenspektrometrischen Analyse zu identifizieren.

Der zweite Aufreinigungsschritt erfolgte mit dem Anionenaustauscher EMD-DEAE-Fractogel (EDF), der die Austauschergruppe Diethylaminoethyl (DEAE) trägt. Die Säule wurde unter Berücksichtigung der Ladekapazität mit der PCA-Fraktion beladen. Die PCA-Fraktion wurde vor dem Auftrag auf die Säule auf eine Salzkonzentration von 50 mM NaCl verdünnt, um die Bindung von schwach bindenden Proteinen an das Säulenmaterial zu ermöglichen. Die Elution erfolgte mit einem Salzgradienten von 50 bis 180 mM NaCl. Um stärker gebundene Proteine von der Säule zu eluieren, wurde die Salzkonzentration schrittweise auf 450 mM und 1 M NaCl erhöht. Der Elutionsschritt bei 1 M NaCl diente gleichzeitig der Reinigung der Säule. Der Säulenlauf wurde in der Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 17 A). PRMT4 eluierte vorwiegend bei einer Salzkonzentration von 80 mM bis 130 mM NaCl in den

Fraktionen 6, 7 und 8 von der EDF-Säule. Aus der Analyse gleicher Volumina des PCA-Inputs im Vergleich zu den EDF-Fraktionen wird ersichtlich, dass PRMT4 über die EDF-Säule angereichert wurde (Abb. 17 A). Aus der Betrachtung des Gesamtproteins in der Silberfärbung in Abbildung Abb. 17 B geht hervor, dass mit zunehmender Salzkonzentration mehr Proteine von der Säule eluierten.

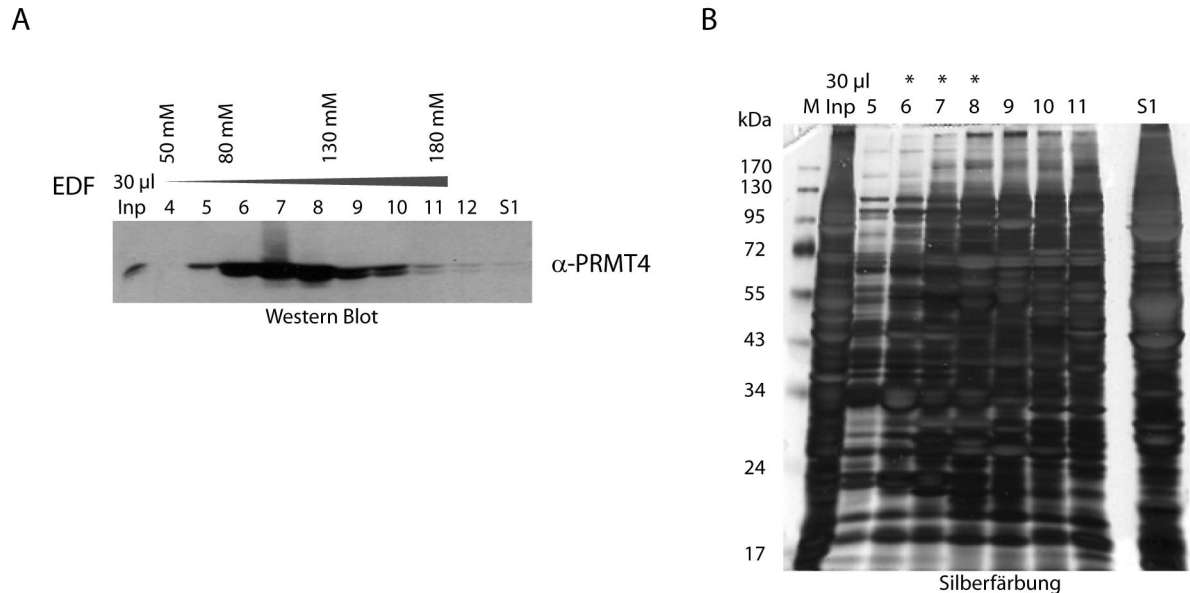


Abb. 17 Aufreinigung von PRMT4 über einen EDF-Anionenaustauscher

A. Eine 30 ml EDF-Säule wurde mit insgesamt 40 ml der Inputfraktion PCA mit 300 mg Protein beladen. Vor dem Auftrag wurde die PCA-Fraktion auf eine Salzkonzentration von 50 mM verdünnt. Die Elution erfolgte in einem Salzgradienten von 50 bis 180 mM NaCl in 64 ml in den Fraktionen 4 - 11 und mit einem 450 mM NaCl-Schritt (S1). Auf ein SDS-Gel wurden 30 µl der verdünnten Inputfraktion PCA, je 30 µl der 8 ml-Fraktionen des Gradienten und der S1-Fraktion geladen. Die Elution wurde im Western Blot mit einer PRMT4-Färbung analysiert. **B.** Aus der PCA-Fraktion, den Fraktionen 5 - 11 des Salzgradienten und des 450 mM NaCl-Elutionsschritts wurden je 30 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mit Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Fraktionen mit der stärksten Anreicherung von PRMT4 sind mit * gekennzeichnet.

Anschließend erfolgte ein Aufreinigungsschritt über den starken Anionenaustauscher MonoQ. Die Säule wurde unter Berücksichtigung der maximalen Bindekapazität mit den vereinigten EDF-Fraktionen 6 und 7 beladen. Die Elution erfolgte mit einem Salzgradienten von 50 bis 250 mM NaCl und einem anschließenden 1 M NaCl-Elutionsschritt. Aus der Analyse des Elutionsprofils im Western Blot wird ersichtlich, dass PRMT4 bei einer Salzkonzentration von 120 bis 200 mM von der MonoQ-Säule eluiert wurde (Abb. 18 A). Aus der Analyse gleicher Volumina des EDF-Inputs im Vergleich zu den MonoQ-Fraktionen geht hervor, dass PRMT4 über die MonoQ-Säule weiter angereichert wurde. Eine Anreicherung von Proteinbanden im Silbergel auf der Höhe von PRMT4 bei 63 kDa konnte jedoch nicht

ausgemacht werden (Abb. 18. B). Aus der Silberfärbung des MonoQ-Laufes geht desweiteren hervor, dass im Vergleich zur Silberfärbung des EDF-Laufes weniger Gesamtprotein in den PRMT4-haltigen Fraktionen angefärbt wurde (Abb. 17 B, Abb. 18 B). Folglich ist über die MonoQ-Säule neben einer Anreicherung von PRMT4 eine weitere Abtrennung von PRMT4 vom Proteingemisch erfolgt.

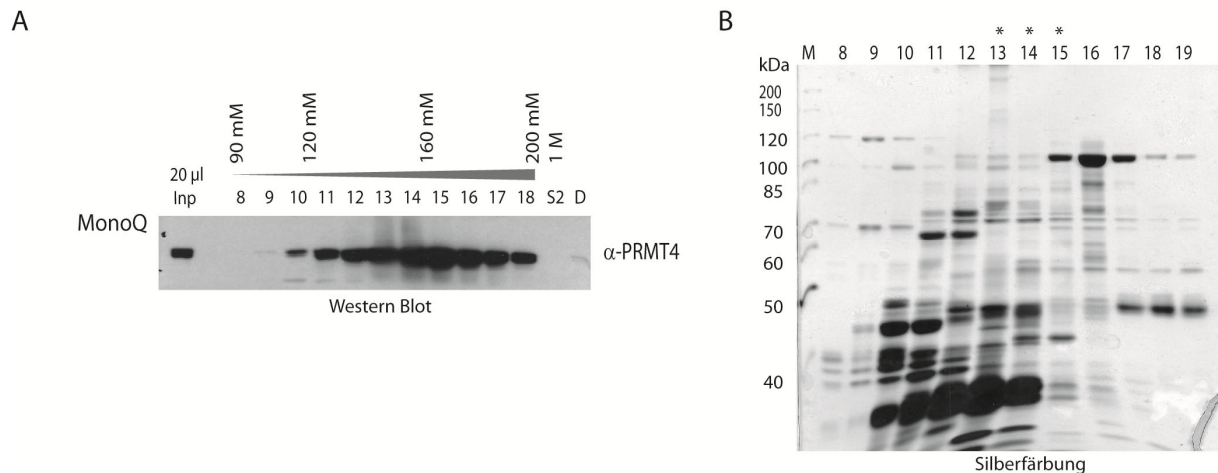


Abb. 18 Aufreinigung von PRMT4 über einen MonoQ-Anionenaustauscher

A. Eine 8 ml MonoQ-Säule wurde mit den EDF-Fractionen 6 und 7 beladen. Vor dem Auftrag wurde der Input auf eine Salzkonzentration von 50 mM NaCl verdünnt und mit einem 50 ml Probenloop auf die MonoQ-Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit einem Salzgradienten von 50 bis 250 mM NaCl in 40 ml. 20 µl der Fraktionen 8 - 18 des Gradienten und der 1 M NaCl-Elution (S2) wurden mit Input auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot analysiert. **B.** Je 20 µl der Fraktionen 8 - 19 des Salzgradienten wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels Silberfärbung angefärbt. Die Fraktionen mit der stärksten Anreicherung von PRMT4 sind mit * gekennzeichnet.

Um weitere Aufreinigungsschritte aus den PRMT4-haltigen Fraktionen anzuschließen, musste zunächst sichergestellt werden, dass die Komplexgröße während der chromatographischen Schritte erhalten bleibt. Daher wurden 100 µl einer MonoQ-Fraktion in einer Superdex 200-Gelfiltration analysiert (Abb. 19). PRMT4 eluierte hauptsächlich in den Fraktionen 21 - 24, was einem Molekulargewicht von 130 bis 400 kDa entspricht und damit dem Elutionsprofil aus Lysaten in Abb. 15 gleicht. Die Komplexgröße blieb also während der Aufreinigung stabil.

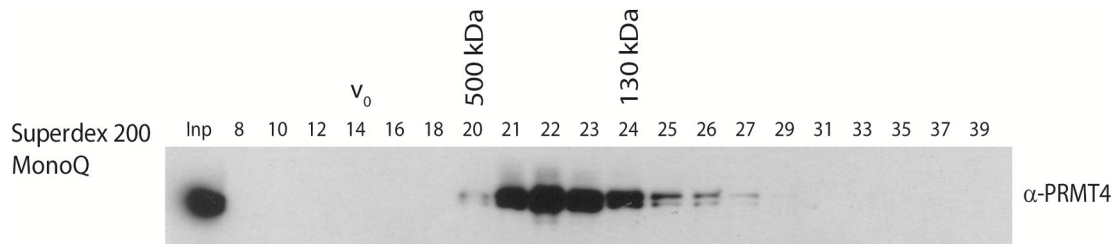


Abb. 19 Analyse der Komplexgröße von PRMT4 aus einer MonoQ-Fraktion in der Gelfiltration

Aus einer PRMT4-haltigen MonoQ-Fraktion (Fraktion 14) wurden 100 µl auf eine Superdex 200-Säule aufgetragen und 500 µl-Fractionen gesammelt. Diese wurden mit Resin-Beads eingeeengt, in einem SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot hinsichtlich PRMT4 analysiert.

Ein Indiz für das Vorliegen funktioneller PRMT4-Komplexe ist das Vorhandensein der Methyltransferaseaktivität. Die Methyltransferaseaktivität aus Fraktionen der EDF- und MonoQ-Säulenläufe auf die Kernhistone H3, H2A, H2B und H4 unter Verwendung des radioaktiv markierten Methylgruppendonors ^{14}C -S-Adenosyl-Methionin (^{14}C -SAM) wurde getestet (Abb. 20). Die EDF-Fractionen 6, 7 und 8 umfassen das Elutionsmaximum von PRMT4. Die Analyse der methylierten Histone in der Fluorographie zeigt eine Zunahme der Methylierungsaktivität auf Histone, vor allem aber auf Histon H3, in den PRMT4-haltigen Fraktionen. Die Methylierungsaktivität dieser Fraktionen beschränkte sich nicht ausschließlich auf Histon H3. Auch die Histone H2A/B und H4 wurden, wenn auch schwächer, methyliert. Da SAM ein genereller Methylgruppendonor für Methyltransferasen ist, befinden sich in den Fraktionen vermutlich weitere Methyltransferasen. Aus Abb. 20 B ist zu entnehmen, dass nach der Aufreinigung über MonoQ mit ansteigender Menge an PRMT4 in Fraktion 15 (Abb. 18 A) ebenfalls eine stärkere Methylierung an Histon H3 festzustellen ist. Im Vergleich zum EDF-Input ist die Methylierungsaktivität in dem gleichen Volumen der MonoQ-Fraktion stärker, was durch die Anreicherung von PRMT4 über die MonoQ-Säule zu erklären sein könnte.

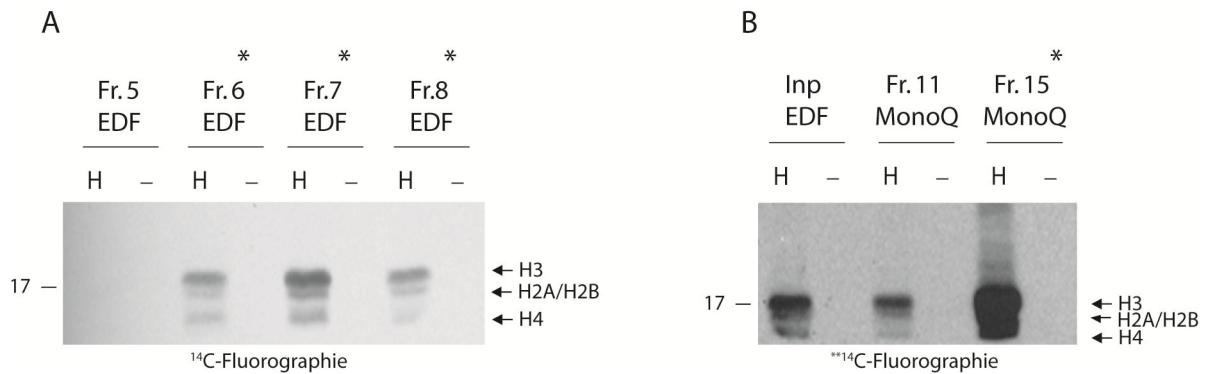


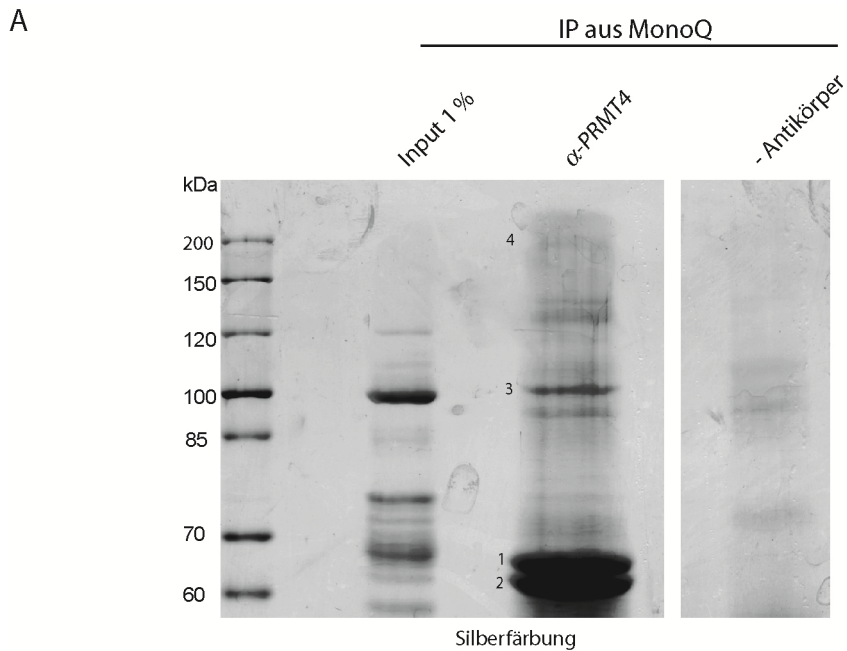
Abb. 20 In-vitro Methylierung von Histonen

A. Je 4 µg der Kernhistone H3, H3A, H2B und H4 aus Kalbsthymus wurden einer Methylierungsreaktion mit 50 µl der EDF-Fractionen 5, 6, 7 und 8 unter Verwendung 0,5 µCi/ml ¹⁴C-SAM als Methylgruppenspendor unterzogen (H). Als Kontrolle wurde die Methylierung ohne Substrat durchgeführt (-). In **B.** erfolgte die Methylierung mit je 10 µl der MonoQ-Fractionen 11 und 15. Jeder Ansatz wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Als Input wurde 10 µl der vereinigten Fractionen 6 und 7 aus dem EDF-Lauf verwendet. Die Methylierungsansätze wurden auf ein 12,5%iges Gel aufgetragen und geblottet. Die getrocknete Membran wurden 1 Tag (**A.**) und 3 Tage (**B.**) einer Fluorographie unterzogen. Mit * gekennzeichneten Fractionen symbolisieren die Elutionsmaxima von PRMT4.

Es ist festzuhalten, dass PRMT4-haltige Komplexe mit einer Größe von 130 bis 400 kDa durch Phosphocellulose-, EDF- und MonoQ-Ionenaustauscher-Chromatographie angereichert werden konnten. Die mit PRMT4 angereicherten Fractionen konnten Histone mit einer Präferenz für Histon H3 methylieren, was ein Hinweis auf das Vorhandensein von aktivem PRMT4 ist. Die Tatsache, dass PRMT4 innerhalb eines engen Salzgradienten von den Anionenaustauscher-Säulen eluiert, ermöglichte einerseits eine grobe Abtrennung aus dem Gesamtproteingemisch und andererseits eine Aufkonzentrierung.

5.2.4. Coimmunpräzipitation und Identifikation von PRMT4-Interaktionspartnern

Die PRMT4-haltigen MonoQ-Fractionen 13 und 14 dienten nun als Ausgangsmaterial für einen spezifischen Aufreinigungsschritt. Mit einem affinitätsaufgereinigten polyklonalen PRMT4-Antikörper (α-PRMT4), wurde PRMT4 präzipitiert und copräzipitierende Proteine in der Massenspektrometrie identifiziert. Folgende Schritte wurden in Zusammenarbeit mit Jürgen Adamkiewicz (AG Müller) durchgeführt. Banden, die in der Silberfärbung nach der IP mit α-PRMT4 im Vergleich zur Kontrolle ohne Antikörper differentiell auftraten, wurden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mit MALDI-TOF massenspektrometrisch analysiert. Die erhaltenen Massenpeaks wurden mit dem Programm BioTools 2 verarbeitet und mit den Datenbanken Mascot und Aldente abgeglichen (Abb. 21).



B

Bande	Protein	Größe	Mascot-Score	Sequenzabdeckung
1	PRMT4 Isoform1 (Q86X55_1)	63 kDa (585 AS)	101	21,5 %
2	PRMT4 Isoform1 (Q86X55_1)	63 (585 AS)	111	28,5 %
3	Alix (Alg-2-interacting protein 1) (Q8WUM4)	96 kDa (868 AS)	143	29 %
4	Mi-2α Isoform 1 (Q12873)	228 kDa	26	5,3 %

Abb. 21 Immunpräzipitation aus PRMT4-haltigen MonoQ-Fractionen

A. Die MonoQ-Fractionen 13 und 14 wurden vereinigt und je 2 ml (1,2 mg Protein) für jede Immunpräzipitation verwendet. Die IP wurde in einem Gesamtvolumen von 6 ml bei einer Salzkonzentration 150 mM NaCl und 0,5 % NP-40 mit 20 µg eines affinitätsaufgereinigten polyklonalen PRMT4-Antikörpers durchgeführt. Nach der Immobilisierung der Antikörper mit 80 µl ProteinA/G-Sepharose wurde diese mit SDS-Probenpuffer aufgekocht und die Überstände zusammen mit 20 µl Input in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen. **B.** Die im Silbergel gekennzeichneten Banden 1 - 4 wurden ausgeschnitten und mit MALDI-TOF analysiert. Eine tabellarische Zusammenfassung der identifizierten Proteine ist dargestellt.

Denen mit 1, 2, 3 und 4 gekennzeichneten Banden konnten eindeutig Proteine zugeordnet werden. Die im Silbergel am deutlichsten sichtbaren Banden 1 und 2 konnten als PRMT4 identifiziert werden (Abb. 21). In den Protein-Datenbanken sind für humanes PRMT4 zwei Isoformen bekannt, Isoform 1 mit 63 und Isoform 2 mit 43 kDa. Die mit einem Score von 111 bessere Übereinstimmung der Massenpeaks aus Bande 2 mit Isoform 1 und die Größe von 63 kDa lässt die Schlussfolgerung zu, dass Bande 2 der humanen Isoform 1 von PRMT4 entspricht. Aus murinen Zellen und aus der Ratte (Variante 1) ist unter anderem eine

PRMT4-Isoform bekannt, die aus 608 AS aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von 65 kDa besitzt (Chen et al. 1999; Ohkura et al. 2005). Bei der höher laufenden Bande 1 könnte es sich um die entsprechende humane Isoform handeln.

Mit dieser Strategie gelang es zwei weitere, bisher im Zusammenhang mit PRMT4 unbekannte Proteine zu identifizieren. Bei Bande 3 handelt es sich um das cytoplasmatisch lokalisierte Protein Alix, das für die Regulation des endosomalen Transports eine Rolle spielt. Auf Grund seiner Interaktion mit ALG-2 ist dieses Protein außerdem in Zusammenhang mit apoptotischen Signalwegen gebracht worden (Mattei et al. 2006). Bei der schwächeren Bande 4 handelt es sich um das nukleär lokalisierte Protein Mi-2 α , einem Chromatinremodeller aus der CHD-Familie, der in der Regulation der Transkription eine Rolle spielt (Marfella and Imbalzano 2007).

5.3. Verifizierung der Interaktionen zwischen PRMT4 und ALIX

5.3.1. Nachweis der Interaktion zwischen PRMT4 und ALIX in der Überexpression

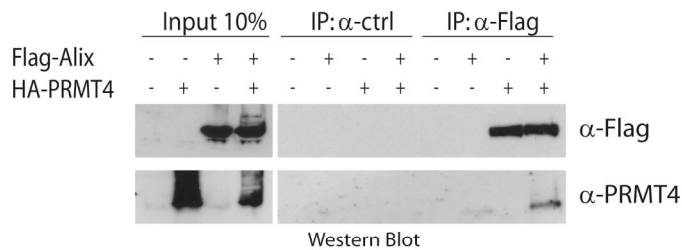
Die in 5.2.4. durchgeführte Coimmunpräzipitation von endogenem PRMT4 führte zur Identifikation des Proteins Alix als potentiellen Interaktionspartner. Diese Interaktion sollte nun mittels Coimmunpräzipitation (CoIP) der überexprimierten Komponenten validiert werden. Zunächst wurde HA-getagtes PRMT4 und Flag-getagtes Alix in HEK293-Zellen jeweils allein oder in Kombination in HEK293-Zellen exprimiert (Abb. 22 A). Anhand des Inputs ist zu erkennen, dass HA-PRMT4 und Flag-Alix gleichmäßig exprimiert wurden. In der IP gegen Flag-Alix unter Verwendung eines Flag-Antikörpers konnte HA-PRMT4 copräzipitiert werden. Im Falle der Expression von HA-PRMT4 ohne Flag-Alix wurde in der α -Flag-IP keine HA-Bande detektiert. Der Flag-Antikörper interagiert also nicht unspezifisch mit HA-PRMT4. Weiterhin traten in der Kontroll-IP weder eine Flag-, noch eine HA-Bande im Western Blot auf (Abb. 22 A).

Während die N-terminale Bro1-Domäne von Alix mit der ESCRT-Maschinerie (*endosomal sorting complexes required for transport*) interagiert, vermittelt die C-terminale prolinreiche Domäne (Pro-Domäne) sehr vielseitige Interaktionen von Alix mit anderen Proteinen (Odorizzi 2006). In HEK293-Zellen wurde neben dem Flag-Alix-Protein in voller Länge (96 kDa) nun C-terminal trunkiertes Flag-Alix Δ C (92 kDa), dem ein Teil der Pro-Domäne fehlt, exprimiert. In Abb. 22 B wurde anhand des Inputs die Expression der Proteine im Western Blot nachgewiesen. In der IP mit einem α -PRMT4-Antikörper in Abb. 22 C konnten Flag-Alix und deutlich schwächer Flag-Alix Δ C copräzipitiert werden, wenn diese zusammen mit HA-PRMT4 exprimiert wurden. In der Expression von Flag-Alix und Flag-Alix Δ C ohne HA-PRMT4 trat keine unspezifische Bindung an den PRMT4-Antikörper auf. Die HA-Färbung zeigt eine gleichmäßige Anreicherung von HA-PRMT4 in der HA-IP. Die IP von Flag-Alix unter Verwendung eines Flag-Antikörpers bewirkte die Copräzipitation von HA-PRMT4 im Vergleich zu α -Flag-IP von HA-PRMT4 ohne Flag-Alix. Dagegen konnte bei gleicher IP-Effizienz der Flag-getagten Proteine keine Interaktion zwischen Flag-Alix Δ C und HA-PRMT4 nachgewiesen werden (Abb. 22 C).

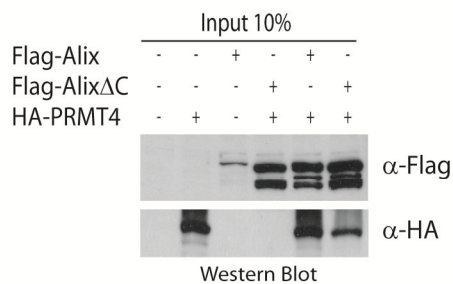
Die Interaktion zwischen Alix und PRMT4 konnte mittels CoIP unter Verwendung von Überexpressionskonstrukten bestätigt werden. Dabei scheint die C-terminale Pro-Domäne an der Interaktion zwischen PRMT4 und Alix beteiligt zu sein. Diese Interaktion wurde in der

folgenden Arbeit nicht weiter verfolgt, da für Alix in der Literatur keine Rolle in der Transkription und auch keine Verbindung zu chromatinabhängigen Funktionen beschrieben ist.

A



B



C

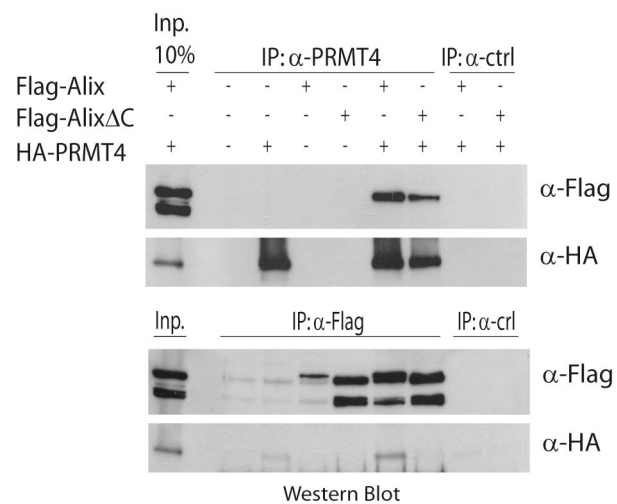


Abb. 22 Coimmunpräzipitation zwischen HA-PRMT4 und Flag-Alix

HEK293 wurden mit Calciumphosphat transfiziert. Die Ansätze enthielten 20 μ g pSG5 HA-PRMT4, 10 μ g pCI Flag-Alix oder 10 μ g pCI Flag-Alix Δ C in den angegebenen Kombinationen und wurden mit den Leervektoren pSG5 HA oder pCDNA3 auf je insgesamt 30 μ g DNA pro Ansatz aufgefüllt. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und in IPH-Puffer lysiert. **A.** Für jede IP wurde 500 μ g IPH-Lysat mit 2 μ g α -Flag und α -Myc als murinen Kontrollantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag 2 h mit Protein A-Sepharose versetzt. Die Präzipitate wurden mit 50 μ g Input im Western Blot mit α -Flag (1:1000, Sigma) und α -HA-Antikörper (1:1000, Roche) gefärbt. **B.** 50 μ g der IPH-Lysate wurden im Western Blot analysiert. **C.** In den IPs wurden je 500 μ g IPH-Lysat mit 7,5 μ l α -PRMT4 und 7,5 μ l 0,1 μ g/ μ l Kaninchen-IgG oder 2 μ g α -Flag und α -Myc als murinen Kontrollantikörper verwendet.

5.4. Analyse der Interaktion von PRMT4 mit Mi-2

5.4.1. Verifizierung der Interaktion zwischen PRMT4 und Mi-2 mittels Coimmunpräzipitation

In der massenspektrometrischen Analyse potentieller Interaktionspartner von PRMT4 wurde der Chromatinremodeller Mi-2 α identifiziert. Die Interaktion zwischen PRMT4 und dem Chromatinremodeller Mi-2 sollte im Folgenden mittels CoIP validiert werden. Auf Grund der ähnlichen Domänenstruktur stellt Mi-2 α zusammen mit Mi-2 β eine Subfamilie der CHD-Familie dar. Daher sollte außerdem die Frage beantwortet werden, ob das homologe Protein Mi-2 β ebenfalls mit PRMT4 interagiert. Da keine Antikörper zu Verfügung standen, die spezifisch entweder Mi-2 α oder Mi-2 β erkannten, wurden Flag-Mi2 α und HA-Mi2 β in HEK293-Zellen überexprimiert. Um auszuschließen, dass unvollständig verdaute DNA eine Interaktion zwischen den Proteinen vermittelt, wurden die in der IP verwendeten Lysate mit Ethidiumbromid versetzt.

Die Expression von Flag-Mi-2 α sowie die endogene Expression von PRMT4 wurde anhand der Western Blot-Färbung der Inputgele gezeigt (Abb. 23 A und B). Die IP von PRMT4 bewirkte eine Copräzipitation des exogenen Flag-Mi2- α im Vergleich zum Kontrollantikörper (Abb. 23 A). Die Anreicherung von PRMT4 ist in der α -PRMT4-Färbung gezeigt. Nun wurde die IP in umgekehrter Richtung durchgeführt. Mit einer α -Flag-IP konnte im Vergleich zu einer Kontroll-IP Flag-Mi-2 α angereichert und PRMT4 copräzipitiert werden (Abb. 23 B). Die in der Massenspektrometrie (siehe 5.2.4.) identifizierte Interaktion zwischen Mi-2 α und PRMT4 konnte somit bestätigt werden.

Mit der folgenden IP wurde die Interaktion zwischen PRMT4 und Mi-2 β untersucht. Es ist anzumerken, dass das verwendete Expressionskonstrukt eine C-Terminale Deletion von 300 Aminosäuren (1619 statt 1912 AS) besitzt. Die Überexpression von HA-Mi-2 β und die endogene Expression von PRMT4 wurde in einer Western Blot-Färbung des Inputgels gezeigt (Abb. 23 C). Die Analyse der Präzipitate der α -PRMT4-IP in der Western Blot-Färbung zeigt eine Copräzipitation von HA-Mi-2 β im Vergleich zur IP mit dem Kontrollantikörper. Die Anreicherung von PRMT4 mit dieser IP wurde anhand der Immunfärbung für PRMT4 nachgewiesen (Abb. 23 C). PRMT4 interagiert folglich auch mit Mi-2 β .

Mittels CoIP konnte daher nachgewiesen werden, dass PRMT4 mit den beiden Mitgliedern der Subfamilie II der CHD-Familie, Mi-2 α und Mi-2 β , interagiert.

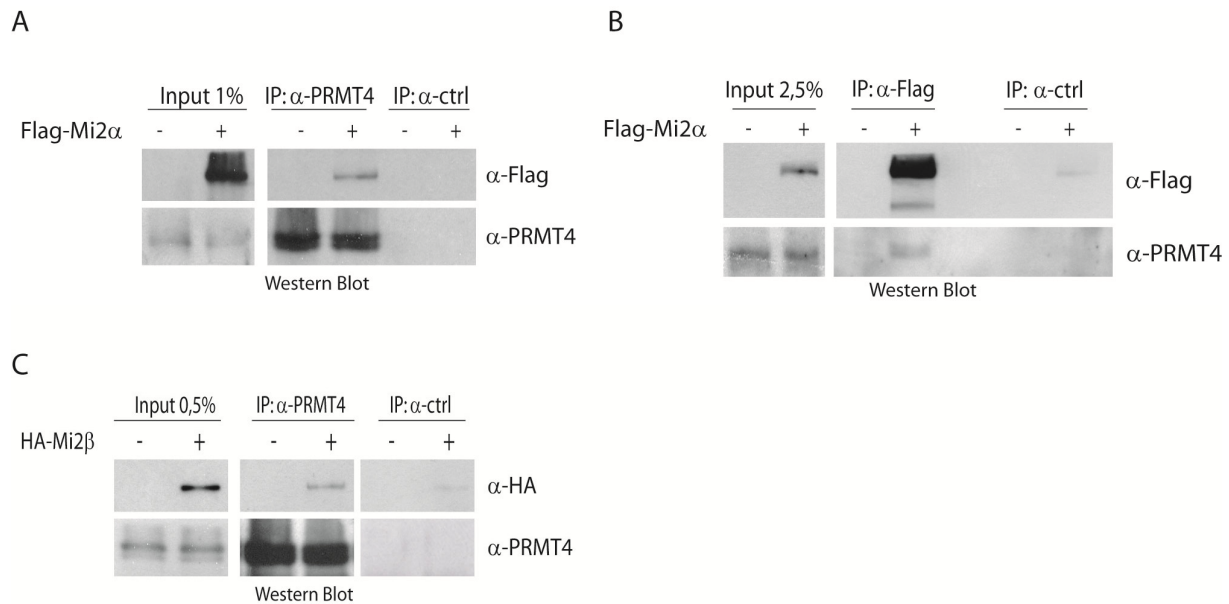


Abb. 23 Coimmunpräzipitation zwischen PRMT4 und Flag-Mi-2α

A. HEK293-Zellen wurden mit 40 µg pCI Flag-Mi-2α durch Calciumphosphat transfiziert, in IPH-Puffer (200 mM NaCl) lysiert und Nukleinsäuren mit Benzonase verdaut. Die IP wurde mit 1 mg Extrakt und 18 µl α-PRMT4 und Kaninchen-Kontrollantikörper unter Zugabe von 10 µg/ml Ethidiumbromid und bei einer Salzkonzentration von 250 mM NaCl für 4 h durchgeführt. Dann wurde 2 h mit ProteinA/G-Sepharose inkubiert. Die Ansätze wurden in der Western Blot-Färbung mit α-Flag- (1:1000) und α-PRMT4 (1:1000) analysiert. **B.** HEK293-Zellen wurden mit 15 µg pCI Flag-Mi-2α, aber insgesamt 40 µg DNA transfiziert. 1 mg IPH-Lysat wurde in der IP verwendet und weiter wie in **A.** verfahren. Der Nachweis von PRMT4 im Western Blot erfolgte mit α-PRMT4 (1:250). **C.** HEK293-Zellen wurden mit 15 µg pCDNA3 HA-Mi-2β oder Leervektor mit insgesamt 40 µg DNA transfiziert. In der IP wurden 800 µg IPH-Lysat verwendet. Die geblottete Membran wurde mit α-HA (1:500, Covance) und α-PRMT4 (1:1000) gefärbt.

5.4.2. Der N-Terminus und die Chromodomäne von Mi-2α sind an der Interaktion mit PRMT4 beteiligt

Um die Interaktion von PRMT4 mit Mi-2α genauer zu charakterisieren, sollte nun die Interaktionsdomäne von Mi-2α in einem IVT (*in vitro-Translation*)-Pulldown kartiert werden. Für den Pulldown wurden die rekombinanten Proteine GST (28 kDa) und GST-PRMT4 (93 kDa) aus *E.coli* BL21 DE3 gewonnen, an Glutathione-Sepharose immobilisiert und gleiche Proteinmengen GST und GST-PRMT4 in einem Coomassiegelel abgeglichen (Abb. 24. A). Neben GST-PRMT4 in voller Länge (*) sind Abbaubanden von GST-PRMT4 im Coomassiegelel zu erkennen. Die in den IVTs verwendeten Deletionskonstrukte von Mi-2α deckten das gesamte Protein ab und umspannen den N-Terminus (Nt), die Tandem-PHD-Domäne (P), die Tandem-Chromodomäne (Ch), die für alle Remodeller charakteristische SNF-like Helikasedomäne (H), und ein größeres C-terminales Fragment (Ct), (Abb. 24 B). In den IVT-Reaktionen wurden die generierten Mi-2α-Proteindomänen mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Um gleiche

Mengen der Proteindomänen im Pulldown mit GST und GST-PRMT4 einzusetzen, erfolgte ein Abgleich der Signalstärken anhand einer Fluorographie (Abb. 24 C). Die Signalstärke des N-Terminus war schwächer als die der anderen Konstrukte. Der Schmier in Spur (Nt) macht deutlich, dass das N-terminale Konstrukt in voller Länge (*) zum Teil degradiert wurde (Abb. 24 C). Der GST-IVT-Pulldown erfolgte wie unter Kapitel 3.4.20. beschrieben. Die Fluorographie des GST-IVT-Pulldowns zeigt, dass sowohl der N-Terminus, als auch die Tandem-Chromodomäne von Mi-2 α mit GST-PRMT4, jedoch nicht mit GST interagierten (Abb. 24 D). Die Interaktion mit der Helikasedomäne musste als unspezifisch erachtet werden, da diese auch mit der GST-Kontrolle interagierte.

Aus diesem Experiment ist zu schlussfolgern, dass die Interaktion zwischen Mi-2 α und PRMT4 durch zwei Domänen vermittelt werden kann, dem N-Terminus und der Tandem-Chromodomäne. Da die Aminosäuresequenzen von Mi-2 α und Mi-2 β bis auf den C-Terminus sehr ähnlich sind, interagiert Mi-2 β vermutlich ebenfalls über diese Domänen mit PRMT4.

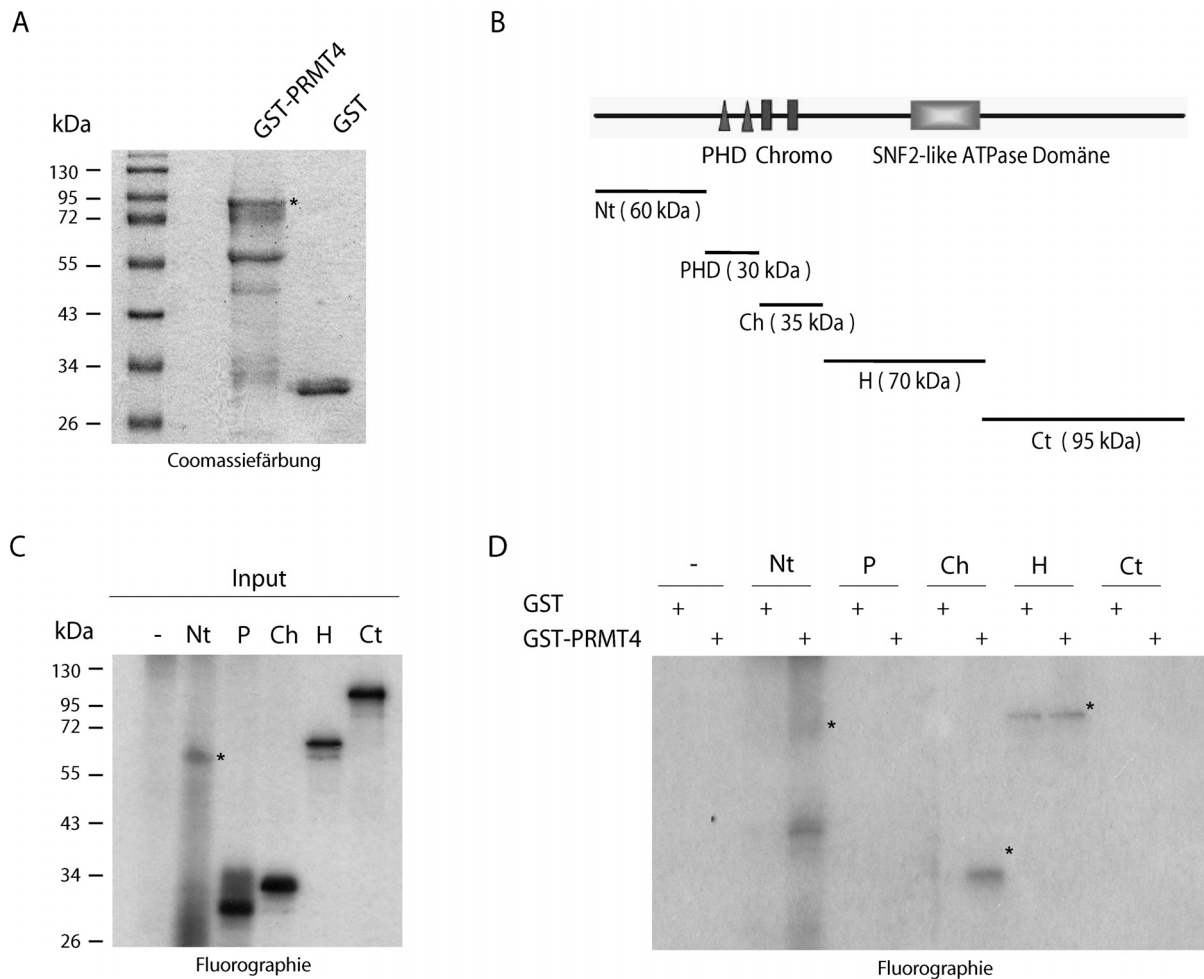


Abb. 24 GST-IVT-Pulldown von Mi-2 α -Deletionskonstrukten mit GST-PRMT4

A. Coomassiegefärbtes Inputgel für 1 μ g GST- und GST-PRMT4. **B.** Schematische Darstellung der verwendeten Deletionskonstrukte von Mi-2 α . N-Terminus (Nt), die Tandem-PHD-Domäne (P), die Tandem-Chromodomäne (Ch), Helikasedomäne (H), und ein größeres C-terminales Fragment (Ct). **C.** Die Mi-2 α -Deletionskonstrukte wurden ausgehend von den entsprechenden pRSET-Plasmiden mittels IVT synthetisiert und dabei mit 35 S-Methionien markiert. Der Input der im Pulldown eingesetzten Mengen an markierten Proteinen wurde in einem SDS-Gel aufgetrennt. **D.** Pulldown mit je 1 μ g der bakteriell aufgereinigten Proteine GST und GST-PRMT4 und den abgeglichenen Mi-2 α -Deletionskonstrukten. Die Ansätze wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Gele aus **C.** und **D.** wurden für 2 h in Enlight Enhancing-Lösung gebadet, getrocknet und **C.** 3 Tage und **D.** für 6 Tage exponiert.

5.4.3. PRMT4 interagiert nicht mit dem NuRD-Komplex

Mi-2 α und Mi-2 β sind als Untereinheiten des multimeren NuRD (*nucleosomal remodeling and deacetylation*)-Komplexes beschrieben. Um eine mögliche Assoziation von PRMT4 mit dem NuRD-Komplex zu untersuchen, wurde die Assoziation von PRMT4 mit den NuRD-Komponenten MBD3 (*methyl-CpG binding domain* Protein) und HDAC1 (Histondeacetylase 1) untersucht. Für die erste Beschreibung des NuRD-Komplexes wurden HeLa-Zellen als Ausgangsmaterial verwendet (Zhang et al. 1998b). Daher wurde Flag-Mi-2 α in HeLa-Zellen

überexprimiert. Die exogene Expression von Flag-Mi-2 α sowie die endogene Expression von MBD3, HDAC1 und PRMT4 wurde in der Western Blot-Färbung des Inputs nachgewiesen (Abb. 25). Die Interaktion zwischen Flag-Mi-2 α mit den NuRD-Komponenten MBD3 und HDAC1 sollte als Positivkontrolle dienen. Die Western Blot-Färbung der Immunpräzipitate zeigt, dass in der IP gegen Flag-Mi-2 α unter Verwendung eines Flag-Antikörpers im Vergleich zum Kontrollantikörper die Proteine HDAC1 und MBD3 copräzipitiert wurden. Die Flag-Färbung der IP beweist die effiziente Präzipitation von Flag-Mi-2 α (Abb. 25). Wurde PRMT4 mit einem PRMT4-Antikörper präzipitiert, konnte zwar Flag-Mi-2 α , jedoch nicht die NuRD-Komponenten MBD3 und HDAC1 copräzipitiert werden. In der IP unter Verwendung des Kontrollantikörpers wurden keine der untersuchten Proteine präzipitiert (Abb. 25). Dieses Experiment belegt, dass PRMT4 nicht mit dem NuRD-Komplex assoziiert.

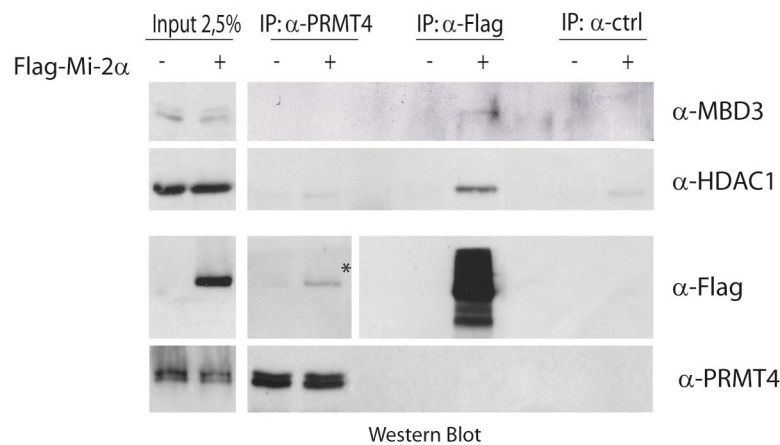


Abb. 25 Interaktion zwischen PRMT4 und Flag-Mi-2 α mit dem NuRD-Komplex

HeLa-Zellen wurden mit 15 μ g pCI Flag-Mi-2 α und insgesamt 40 μ g DNA mittels Calciumphosphat transfiziert, in IPH-Puffer (200 mM NaCl) lysiert und Nukleinsäuren mit Benzonase verdaut. Die IP wurde mit 1 mg Extrakt und 18 μ l α -PRMT4, 2 μ g α -Flag oder Kontrollantikörper unter Zugabe von 10 μ g/ml Ethidiumbromid und bei einer Salzkonzentration von 220 mM NaCl für 4 h durchgeführt. Dann wurde 2 h mit ProteinA/G-Sepharose inkubiert. Die Ansätze wurden zusammen mit Input im Western Blot gegen α -MBD3 (1:500), α -PRMT4 (1:1000) bzw. α -Flag (1:1000) und α -HDAC1 (1:2000) gefärbt.

5.5. PRMT4 und Mi-2 interagieren mit dem Transkriptionsfaktor c-Myb

Der Chromatinremodeller Mi-2 ist vorwiegend mit der Funktion als transkriptioneller Repressor in Verbindung gebracht worden (Denslow and Wade 2007). Da PRMT4 in der Literatur hauptsächlich als transkriptioneller Coaktivator beschrieben ist und nicht mit dem NuRD-Komplex interagiert (Abb. 25), könnte es sein, dass Mi-2 in Assoziation mit PRMT4 eine transkriptionsaktivierende Funktion einnimmt. Tatsächlich gibt es in der Literatur vereinzelt Hinweise auf eine aktivierende Rolle von Mi-2 in der Transkription. So wurde gezeigt, dass Mi-2 α mit dem Transkriptionsfaktor c-Myb in einem *Two-Hybrid-Assay* und in der CoIP interagiert und als transkriptioneller Coaktivator für c-Myb wirkt. Das Mi-2 α verwandte Protein Mi-2 β wurde in dieser Studie nicht betrachtet (Saether et al. 2007). Zuerst sollte daher die Frage beantwortet werden, ob auch Mi-2 β mit c-Myb interagiert. Da PRMT4 mit Mi-2 α und Mi-2 β interagiert und Mi-2 α in der Literatur als Interaktionspartner von c-Myb beschrieben wurde, war weiterführend interessant zu untersuchen, ob PRMT4 und c-Myb miteinander interagieren.

5.5.1. Mi-2 α und Mi-2 β interagieren mit c-Myb

Zur Reproduktion der Interaktion zwischen Mi-2 α und c-Myb wurden Flag-Mi-2 α und HA-c-Myb in HEK293-Zellen allein oder in Kombination exprimiert. Die Western Blot-Färbung des Inputs zeigt eine gleichmäßige Expression von HA-c-Myb und Flag-Mi-2 α (Abb. 26 A). Nach der IP mit einem Flag-Antikörper gegen Flag-Mi-2 α war HA-c-Myb im Western Blot nur dann nachweisbar, wenn beide Proteine cotransfiziert wurden (Abb. 26 A).

In einer weiteren CoIP wurde nun untersucht, ob Mi-2 β im Vergleich zu Mi-2 α ebenfalls in der Lage ist mit c-Myb zu interagieren. In HEK293-Zellen wurden Flag-Mi-2 α oder HA-Mi-2 β zusammen mit HA-c-Myb exprimiert. Anhand der Western Blot-Färbung des Inputgels wurde die Überexpression der Proteine nachgewiesen (Abb. 26 B). Da HEK293-Zellen kein endogenes c-Myb exprimieren, wurde mit einer IP gegen c-Myb ausschließlich das exogene HA-c-Myb angereichert. In der Analyse der Präzipitate in der Western Blot-Färbung konnte sowohl Flag-Mi-2 α als auch HA-Mi-2 β detektiert werden. Die Proteine wurden dabei nicht unspezifisch an einen Kontrollantikörper gebunden. Eine gleichmäßige Effizienz in der IP von c-Myb wurde mit der Färbung des HA-Tags von c-Myb belegt (Abb. 26 B). Dieses Ergebnis zeigt, dass c-Myb sowohl Mi-2 α als auch mit Mi-2 β interagiert.

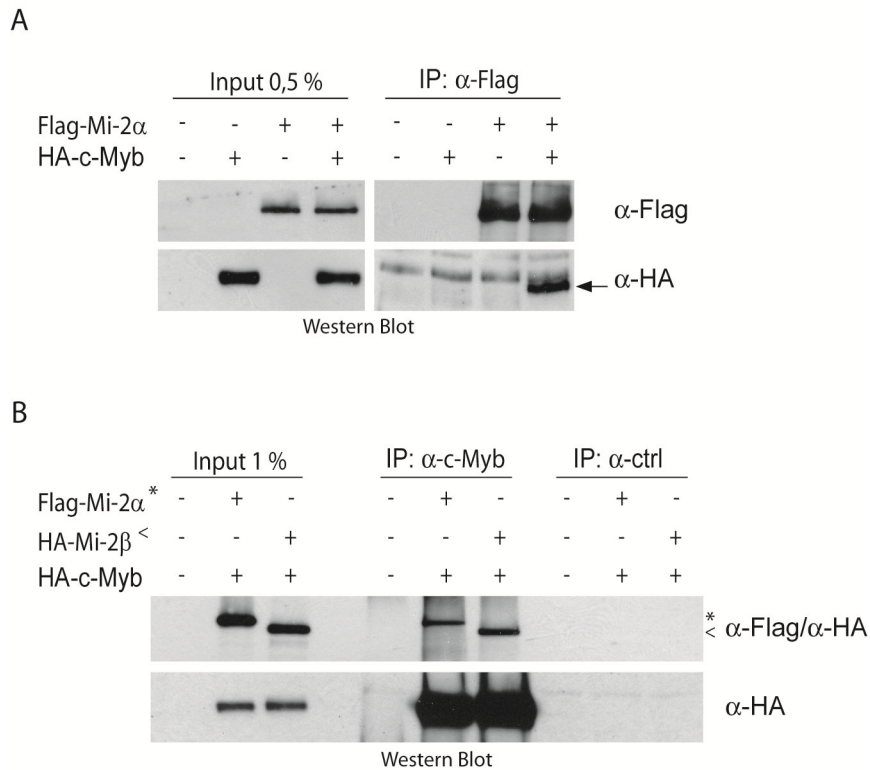


Abb. 26 CoIP von c-Myb mit Flag-Mi-2 α und HA-Mi-2 β

A. HEK293-Zellen wurden mit 10 μ g pCI Flag-Mi-2 α und 30 μ g pCDNA3 HA-c-Myb einzeln oder in Kombination pro 14 cm-Schale mit Calciumphosphat transfiziert. Die IPH-Lysate wurden mit Benzonase behandelt und auf eine Konzentration von 75 mM NaCl verdünnt. Je 1 mg IPH-Lysat wurde mit 2 μ g α -Flag oder murinem IgG eingesetzt. Die IP und 5 μ g Input wurden im Western Blot nach α -Flag (1:2000) und α -HA (1:1000, Covance) analysiert. **B.** HEK293-Zellen wurden mit 15 μ g pCI-Flag-Mi-2 α oder pCDNA3 HA-Mi-2 β zusammen mit 30 μ g pCDNA3 HA-c-Myb transfiziert und in 200 mM IPH-Lysepuffer geerntet. In den IPs wurden je 500 μ g Lysat mit 1 μ g α -c-Myb und murinem IgG für 4 h inkubiert und die Immunkomplexe für 2 h mit ProteinA/G-Sepharose gebunden. Die IP und 5 μ g Input wurden im Western Blot nach α -Flag (1:500) und α -HA (1:1000, Covance) gefärbt.

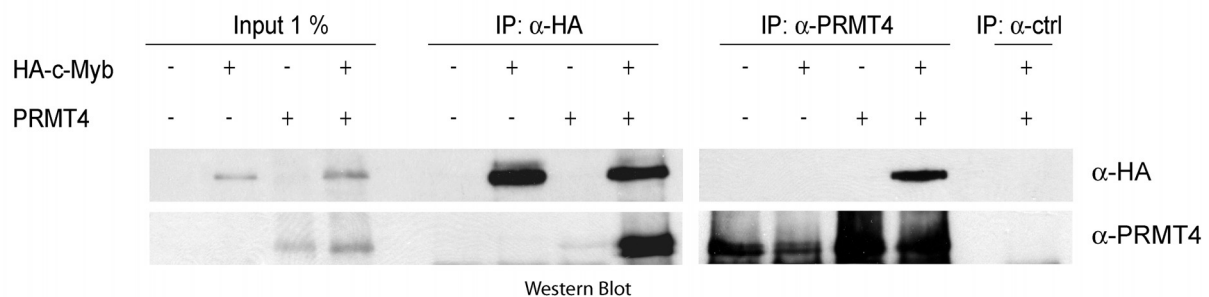
5.5.2. PRMT4 interagiert mit c-Myb in der Überexpression und endogen

Da PRMT4 und c-Myb den gleichen Interaktionspartner, nämlich Mi-2, haben, lag die Frage nahe, ob PRMT4 mit c-Myb interagieren kann. Um diese Frage zu beantworten wurden zunächst HEK293-Zellen mit Expressionskonstrukten für PRMT4 und c-Myb jeweils einzeln und in Kombination transfiziert. Die Inputfärbung belegt, dass die Proteine gleichmäßig exprimiert wurden (Abb. 27 A). Mit der α -HA-Färbung in der Western Blot-Analyse wurde eine gleichmäßige und effiziente Anreicherung des HA-c-Myb in der α -HA-IP nachgewiesen. Anhand der Färbung von PRMT4 wird deutlich, dass in der HA-IP überexprimiertes PRMT4 dann copräzipitiert wurde, wenn HA-c-Myb und PRMT4 zusammen exprimiert vorlagen (Abb. 27 A). In der α -PRMT4-IP wurde sowohl exogenes als auch schwächer endogenes

PRMT4 immunpräzipitiert. Eine Copräzipitation von HA-c-Myb konnte jedoch nur in der Coexpression mit PRMT4 gezeigt werden. (Abb. 27 A).

Um die Interaktion zwischen c-Myb und PRMT4 auf endogener Ebene zu überprüfen wurde ein Zellsystem ausgewählt, in dem c-Myb endogen gut exprimiert wird. Die Inputfärbung zeigt, dass Jurkat-Zellen gut detektierbare Mengen c-Myb und PRMT4 aufweisen (Abb. 27 B). Nach einer PRMT4-IP war eine Copräzipitation von c-Myb zu beobachten, während die Kontroll-IP negativ war (Abb. 27 B).

A



B

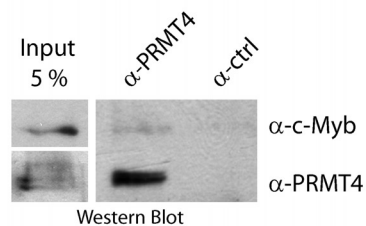


Abb. 27 CoIP zwischen c-Myb und PRMT4

A. HEK293-Zellen wurden mittels Calciumphosphat mit 25 μ g pCDNA3.1 PRMT4 und 25 μ g pCDNA3 hc-Myb-HA jeweils einzeln und in Kombination transfiziert. Ggf. wurde mit Leervektor auf 50 μ g aufgefüllt. Die IP wurde bei einer Salzkonzentration von 75 mM NaCl und 0,5 % NP-40 unter Verwendung von 1 mg Lysat durchgeführt. 17,5 μ l α -PRMT4, 2 μ g α -HA und 2 μ g Kaninchen-IgG (Pierce) wurden verwendet. Die Präzipitate wurden mit 10 μ g Input in einem 10 % igem SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit α -PRMT4 und α -HA (je 1:1000) analysiert. **B.** Jurkat-Zellen wurden mit IPH-Puffer mit einer Salzkonzentration 200 mM lysiert und mit Benzonase behandelt. 800 μ g Lysat wurde mit 4 μ g α -PRMT4 (Ziege, Santa Cruz) und mit α -p15 (Ziege, Santa Cruz) als Kontrollantikörper für 4 h inkubiert. Die Präzipitate wurden mit 40 μ g Input im Western Blot mit α -c-Myb und α -PRMT4 (je 1:500) analysiert.

5.5.3. PRMT4 und c-Myb interagieren in einem *in-vitro*-Pulldown

Im folgenden Kapitel sollte mittels GST-Pulldown untersucht werden, ob PRMT4 und c-Myb direkt interagieren und ob diese Interaktion spezifisch für PRMT4 ist. Dafür wurden die rekombinanten Proteine GST (28 kDa), GST-PRMT1 (68 kDa) und GST-PRMT4 (93 kDa), GST-PRMT6 (70 kDa) sowie His-c-Myb (90 kDa) aus *E.coli* BL21 DE3 aufgereinigt. Dabei wurden

die GST-Proteine an Glutathion-Sepharose immobilisiert. His-c-Myb wurde von der Ni-Agarose eluiert. Die im Pulldown eingesetzten Mengen der rekombinanten Proteine wurden in einem Coomassiegel abgeglichen (Abb. 28 unten). Aus der Western Blot-Färbung des GST-Pulldowns mit einem c-Myb-Antikörper geht hervor, dass GST-PRMT4 deutlich und GST-PRMT1 schwach mit His-c-Myb interagierten. Das Kontrollprotein GST, sowie GST-PRMT6 zeigten keine Bindung an His-c-Myb (Abb. 28).

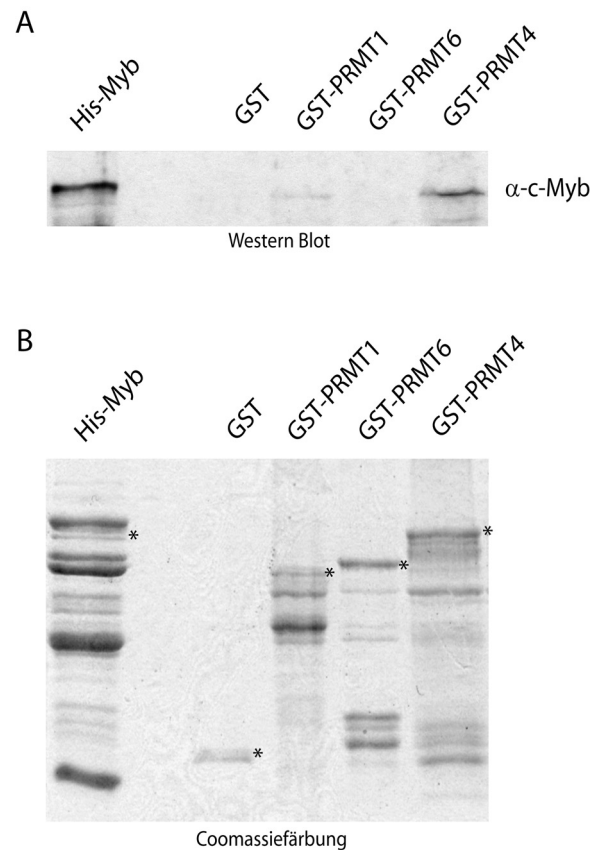


Abb. 28 GST-Pulldown verschiedener PRMTs mit His-c-Myb

A. Der Pulldown erfolgte in einem Gesamtvolumen von 500 μ l bei einer Salzkonzentration von 250 mM NaCl mit 1 % NP-40 bei 4°C für 1 h. Die 4 x mit IPH-Puffer (250 mM, 1 % NP-40) gewaschene Sepharose wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt, zusammen mit 1 μ g His-c-Myb Input in einem SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Analyse des Pulldowns erfolgte mit einem α -c-Myb-Antikörper. **B.** Etwa 1 μ g Glutathion-Sepharose gebundene rekombinante Proteine GST (28 kDa), GST-PRMT1 (68 kDa), GST-PRMT6 (70 kDa), GST-PRMT4 (93 kDa) und 1 μ g eluiertes His-c-Myb (90 kDa) wurden in einem Coomassiegel abgeglichen.

In Abschnitt 5.5.2 wurde in der CoIP sowohl mit Überexpression der Interaktionspartner als auch für die endogenen Proteine gezeigt, dass PRMT4 mit c-Myb interagiert. Dabei handelt es sich um eine direkte Interaktion, da die Interaktion ebenso im GST-Pulldown mit rekombinanten Proteinen nachgewiesen werden konnte. Neben PRMT4 wurde auch für PRMT1 eine schwache Interaktion mit c-Myb im Pulldown beobachtet.

5.6. PRMT4 und Mi-2 kooperieren in der c-Myb-abhängigen Genexpression

Da Mi-2 α in der Literatur als Aktivator für die c-Myb-abhängige Genexpression beschrieben ist, PRMT4 ein bekannter Coaktivator für verschiedene Transkriptionsfaktoren darstellt und in dieser Arbeit eine Interaktion von PRMT4 sowohl mit den Proteinen Mi-2 α und Mi-2 β als auch mit c-Myb nachgewiesen wurde, ergaben sich folgende Fragestellungen: Ist PRMT4 ebenfalls ein Coregulator für c-Myb und beeinflussen sich Mi-2 und PRMT4 möglicherweise in der Regulation der c-Myb-vermittelten Genexpression?

Ein Modellsystem für die Untersuchung der c-Myb-abhängigen Genexpression ist die transformierte Hühnchen-Makrophagenzelllinie HD11. Diese Zelllinie exprimiert zwar den für die Myb-vermittelte Genexpression nötigen Transkriptionsfaktor C/EBP β , jedoch nicht den Transkriptionsfaktor c-Myb selbst. Durch Einbringen von exogenem c-Myb kann die c-Myb-abhängige Genexpression anhand zweier Zielgene, *mim-1* (*Myb-inducible myelomonocytic 1*) und Lysozym, untersucht werden (Ness et al. 1989; Introna et al. 1990; Burk et al. 1993; Ness et al. 1993; Yamkamon et al. 2008). *Mim-1* wurde ursprünglich als direktes Zielgen des onkogenen v-Myb aus dem Vogelleukämievirus E26 identifiziert und ist ein Marker promyeloider Zellen (Ness et al. 1989). Lysozym wird während der Differenzierung von Makrophagen hochreguliert und wird ebenfalls durch eine direkte Bindung von c-Myb reguliert (Krystosek and Sachs 1976; Ivanova et al. 2007).

5.6.1. PRMT4 und Mi-2 aktivieren c-Myb-abhängige Zielgene in transformierten Makrophagen

Um eine regulatorische Funktion von Mi-2 und PRMT4 auf die c-Myb-vermittelte Genexpression zu untersuchen, sollten die mRNA-Level des *mim-1*- und Lysozymgens mittels RT-qPCR nach Coexpression von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 α oder Mi-2 β in HD11-Zellen untersucht werden. HD11-Zellen wurden zunächst mit Expressionskonstrukten für c-Myb, HA-PRMT4 in Kombination mit Flag-Mi-2- α (Abb. 29 A) oder Flag-Mi-2 β (Abb. 29 B) transfiziert und die Proteinexpression im Western Blot analysiert (Abb. 29). Anhand der Western Blot-Färbung ist zu erkennen, dass die transfizierten Konstrukte in HD11-Zellen exprimiert wurden. Die Proteinmengen von c-Myb waren nicht durch eine Coexpression mit PRMT4 und Mi-2 beeinflusst. Eine gegenseitige Beeinflussung in der Proteinexpression von PRMT4 und Mi-2 war nicht zu beobachten.

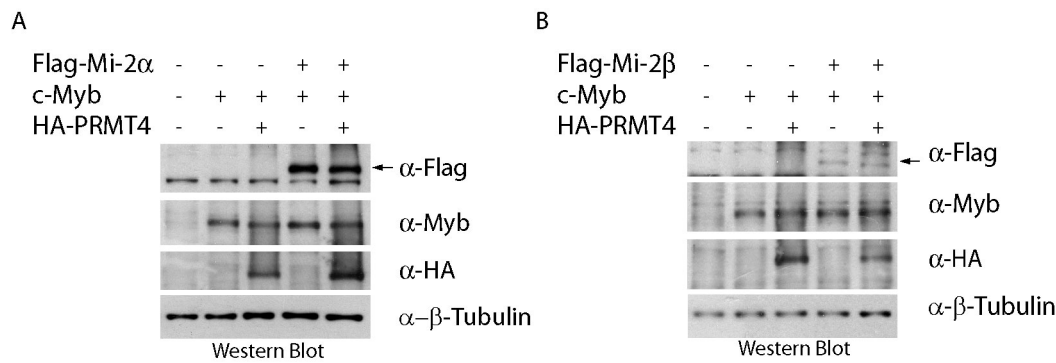


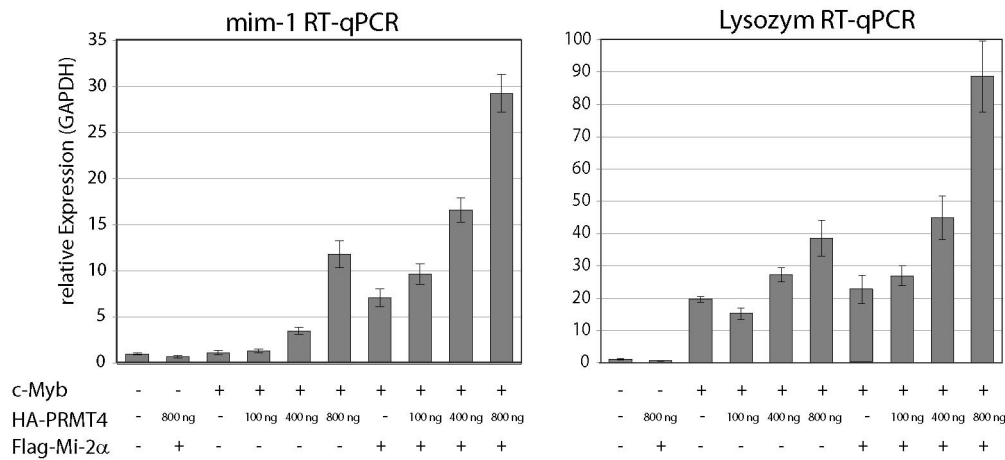
Abb. 29 Expression von c-Myb, HA-PRMT4 und Flag-Mi-2 in HD11-Zellen

A. HD11-Zellen wurden mit 100 ng pCDNA3.1 m-c-Myb-Flag, 600 ng pSG5 HA-PRMT4, 600 ng pCI Flag-Mi-2α in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Es wurde mit pCDNA3 Leervektor auf insgesamt 1,3 µg DNA aufgefüllt und mit Fugene HD transfiziert. **B.** Statt pCI Flag-Mi-2α wurde pCDNA3 Flag-Mi-2β transfiziert. **A. und B.** Die Zellen wurden in IPH-Puffer geerntet und mit Benzonase verdaut. 20 µg der IPH-Lysate wurden in der Western Blot-Färbung mit α-Flag (1:500); α-Myb (1:500); α-HA (1:1000) und α-β-Tubulin analysiert.

Für die Analyse der transkriptionellen Expression wurden HD-11-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion geerntet und für die Präparation von Gesamt-RNA verwendet. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und für die Bestimmung der relativen Expression von mim-1 und Lysozym in der qPCR verwendet. Die transfizierte Menge an c-Myb wurde so gewählt, dass eine schwache Aktivierung der Zielgene mim-1 und Lysozym zu verzeichnen war. In Abb. 30 A und B war mim-1 durch c-Myb alleine 1,3- bis 4-fach und Lysozym 20-fach im Vergleich zu Leervektorkontrolle induziert. Um den Einfluss von PRMT4 auf die c-Myb-abhängige Genexpression zu untersuchen, wurde pSG5 HA-PRMT4 in ansteigenden Mengen von 100 bis 800 ng mit c-Myb cotransfiziert. Mit zunehmender Menge an HA-PRMT4 stieg die Transkriptmenge von mim-1 und Lysozym an. Dabei war bei der höchsten PRMT4-Menge die Transkription von mim-1 10-fach und die von Lysozym 2-fach im Vergleich zu c-Myb alleine erhöht. Wurde c-Myb mit Flag-Mi-2α cotransfiziert, ist die c-Myb-vermittelte Expression des mim-1-Gens im Vergleich zu c-Myb allein durch Mi-2α coaktiviert. Eine Cotransfektion von c-Myb mit Mi-2α hatte auf die Transkription des Lysozymgens keine aktivierende Wirkung. Wurde dann zusätzlich HA-PRMT4 in ansteigenden Mengen cotransfiziert, stieg die Expression weiter an und erreichte bei 800 ng HA-PRMT4 eine relative Expression von 30-fach für mim-1 und von 90-fach für Lysozym. HA-PRMT4 und Flag-Mi-2α aktivieren mim-1 und Lysozym um mehr als die Summe der Einzeleffekte von HA-PRMT4 und Flag-Mi-2α. Daher kann man hier von einer Synergie beider Coregulatoren sprechen. Diese Effekte sind

c-Myb-vermittelt, da HA-PRMT4 und Flag-Mi-2 α ohne c-Myb keine Auswirkung auf die Expression von mim-1 und Lysozym hatten (Abb. 30 A).

A



B

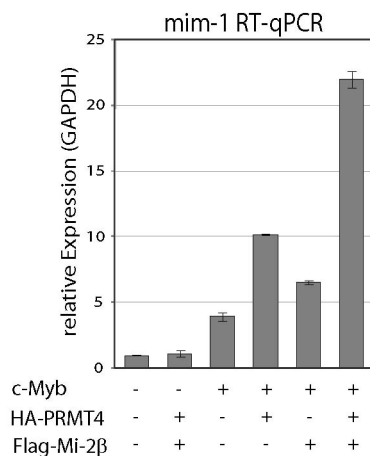


Abb. 30 Coaktivierung der c-Myb-vermittelten Genexpression durch PRMT4 und Mi-2

A. HD11-Zellen wurden mit 100 ng pCDNA3.1 m-c-Myb-Flag, 100 ng pCI Flag-Mi-2 α und pSG5 HA-PRMT4 in aufsteigenden Mengen von 100 ng bis 800 ng und in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Es wurde mit pCDNA3 oder pSG5HA Leervektor auf insgesamt 1,3 μ g DNA aufgefüllt und mit Fugene transfiziert. Die Zellen wurden in RNA-Lysepuffer geerntet und Gesamt-RNA präpariert. Die Transkriptmengen von mim-1 und Lysozym wurden in der RT-qPCR analysiert. Die Expression wurde gegen die GAPDH-Expression standardisiert und die basale Expression in der Leervektorkontrolle 1 gesetzt. **B.** HD11-Zellen wurden mit 100 ng pCDNA3.1 m-c-Myb-Flag, 600 ng pCI Flag-Mi-2 α und 600 ng pSG5 HA-PRMT4 in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Ansonsten wurde wie in **A.** verfahren.

In Abb. 30 B wurde das Mi-2 α verwandte Protein Mi-2 β bezüglich der Aktivierung von mim-1 untersucht. Eine Transfektion von HA-PRMT4 und Flag-Mi-2 β ohne c-Myb hatte keinen Effekt auf die Transkriptmengen von mim-1. Die Transfektion von c-Myb führte zu einer etwa 4-fachen Aktivierung. Lagen HA-PRMT4 bzw. Flag-Mi-2 β mit c-Myb vor, war die relative

Expression von *mim-1* auf etwa 10- bzw. 6-fach erhöht. Waren PRMT4, Mi-2 β und c-Myb gemeinsam transfiziert, stieg die relative Expression von *mim-1* auf 22-fach an. Dieses Experiment zeigt, dass auch Mi-2 β mit PRMT4 in der c-Myb-abhängigen Genexpression kooperiert (Abb. 30 B).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Argininmethyltransferase PRMT4 sowie die beiden verwandten Remodellerproteine Mi-2 α und Mi-2 β Coaktivatoren von c-Myb darstellen. Dabei kann PRMT4 mit Mi-2 α und Mi-2 β in der c-Myb-vermittelten Transkription synergistisch kooperieren.

5.6.2. Die katalytische Aktivität der Coaktivatoren ist essentiell für die Verstärkung der c-Myb-abhängigen Genexpression

Aus der Literatur ist bekannt, dass die katalytische Aktivität für die Coaktivatorfunktion von PRMT4 essentiell ist. Die katalytisch inaktive Mutante PRMT4VLD kann den Methylgruppendonor SAM nicht mehr binden. Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage die ER-vermittelte Transkription in einem Reportergen-Assay zu coaktivieren (Chen et al. 1999).

Um zu untersuchen, ob die katalytische Funktion von PRMT4 und Mi-2 für die Coaktivierung der c-Myb-vermittelten Transkription wichtig ist, wurden HD11-Zellen mit den katalytischen Mutanten HA-PRMT4VLD und Flag-Mi-2 α K767A (helle Balken) im Vergleich zu den wildtypischen Konstrukten HA-PRMT4 und Flag-Mi-2 α (dunkle Balken) transfiziert (Abb. 31). Die gleichmäßige Expression von HA-PRMT4 und Flag-Mi-2 α in der wildtypischen und mutierten Form wurde im Western Blot durch Färbung des HA- und Flag-Tags bestätigt (Abb. 31 unten). Aus der Analyse der relativen Expression von *mim-1* und Lysozym mittels RT-qPCR ging hervor, dass die c-Myb-abhängige Genexpression von *mim-1* und Lysozym nicht durch die Cotransfektion der katalytischen Mutanten verstärkt wurde (Abb. 31). Weiterführend wurde überprüft, ob die synergistische Kooperation von Flag-Mi-2 α und HA-PRMT4 beeinträchtigt ist, wenn ein Coaktivator katalytisch defizient ist. Dafür wurde c-Myb mit beiden Coaktivatoren in der wildtypischen oder katalytisch defizienten Form in den angegebenen Kombinationen cotransfiziert (Abb. 31). Ist einer der Coaktivatoren mutiert, führte das bereits zu einem Verlust der synergistischen Kooperativität. Für eine synergistische Kooperation von PRMT4 und Mi-2 ist daher die katalytische Aktivität des anderen Coaktivators essentiell.

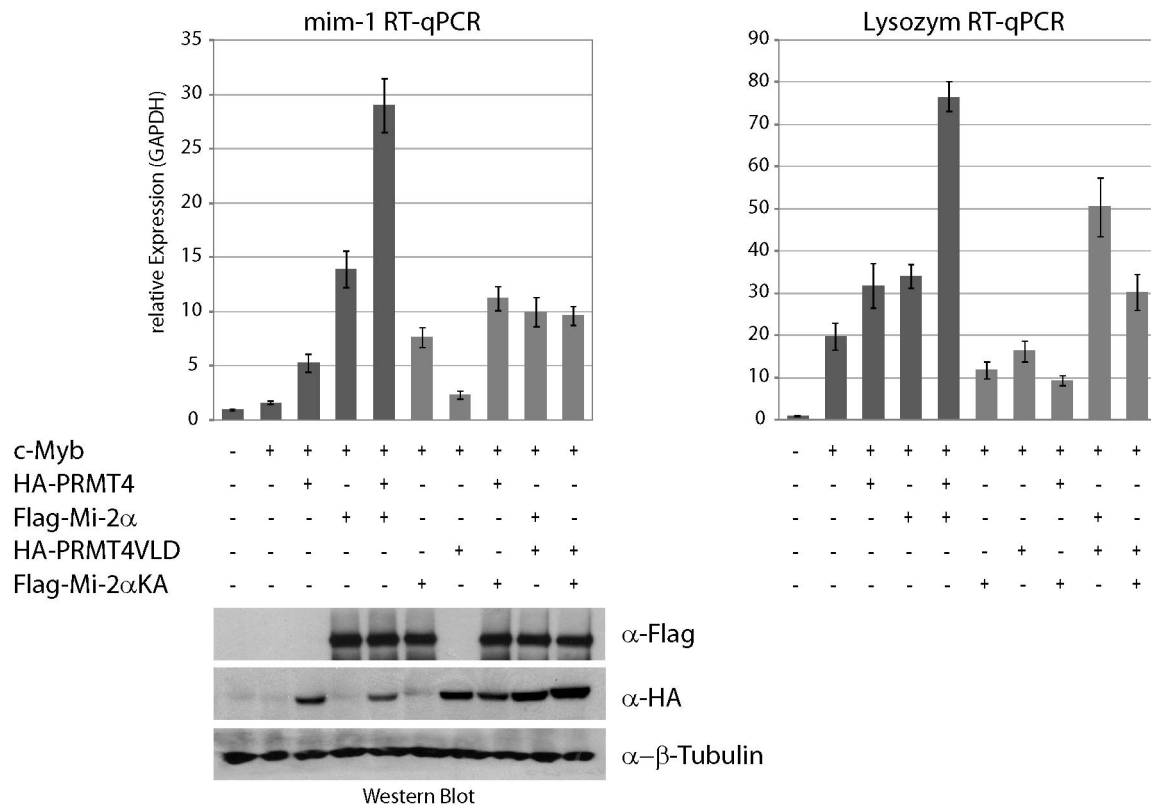


Abb. 31 Rolle der katalytischen Aktivität der Koaktivatoren PRMT4 und Mi-2α

HD11-Zellen wurden mit 100 ng pCDNA3.1 m-c-Myb-Flag, 600 ng pCI Flag-Mi-2α und 600 ng pSG5 HA-PRMT4 oder 600 ng der katalytischen Mutanten pCI-Flag-Mi-2αK767A und pSG5 HA-PRMT4VLD in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Es wurde mit pCDNA3 oder pSG5HA Leervektor auf insgesamt 1,3 µg DNA aufgefüllt und mit FugeneHD transfiziert. Die Zellen wurden in RNA-Lysepuffer geerntet und Gesamt-RNA präpariert. Die mRNA wurde unter Verwendung eines OligodT-Primers in cDNA umgeschrieben und in der qPCR mit Primern gegen mim-1 und Lysozym analysiert. Die Expression wurde gegen die GAPDH-Expression standardisiert und die basale Expression in der Leervektorkontrolle 1 gesetzt. Die Expression der Konstrukte wurden anhand der Tags in der Western Blot-Färbung nachgewiesen.

5.6.3. PRMT4 kooperiert nicht mit PRMT1 in der c-Myb-vermittelten Genexpression

Für PRMT1 und PRMT4 ist bekannt, dass sie sowohl kooperierende als auch individuelle Koaktivatoren der Transkription sind (Koh et al. 2001; Chen et al. 2002). PRMT5 und PRMT6 sind hingegen mit transkriptioneller Repression in Verbindung gebracht worden (Pal et al. 2004; Hyllus et al. 2007).

Mit dem folgenden Experiment wurde nun die Rolle weiterer PRMTs auf die c-Myb-abhängige Genexpression untersucht. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, ob PRMT4 mit PRMT1 die transkriptionelle Aktivität von c-Myb kooperativ verstärkt. Dazu wurden HD11-Zellen neben c-Myb mit Myc-getagtem PRMT6 oder PRMT1, oder HA-getagtem PRMT4 transfiziert. Die Proteinexpression wurde im Western Blot anhand des Tags

nachgewiesen (Abb. 32 unten). Die Transkriptmenge von *mim-1* und Lysozym wurden mit RT-qPCR untersucht (Abb. 32 oben). PRMT4 bewirkte wie zuvor beobachtet eine Erhöhung der Transkriptmengen. Eine Coexpression von PRMT1 mit c-Myb führte zu einer verringerten relativen Expression von *mim-1* und Lysozym. Wurde PRMT1 zusammen mit PRMT4 und c-Myb in HD11-Zellen eingebracht, ging der Effekt der Coaktivierung durch PRMT4 beim *mim-1*-Gen vollständig verloren. Im Falle des Lysozymgens hatte die Coexpression von PRMT1 keinen Einfluss auf die Coaktivierung durch PRMT4. PRMT6 wirkte bei beiden Genen reprimierend auf die c-Myb-vermittelte Genexpression, da die relative Expression beider Gene auf die basale Expression in der Leervektorkontrolle zurückging (Abb. 32).

Die transkriptionelle Aktivierung der c-Myb-vermittelten Genexpression durch PRMT4 ist also kein genereller Effekt von PRMTs, sondern spezifisch für PRMT4. Außerdem ist c-Myb ein Transkriptionsfaktor, mit dem PRMT4 nicht in Kooperation mit PRMT1 wirken kann.

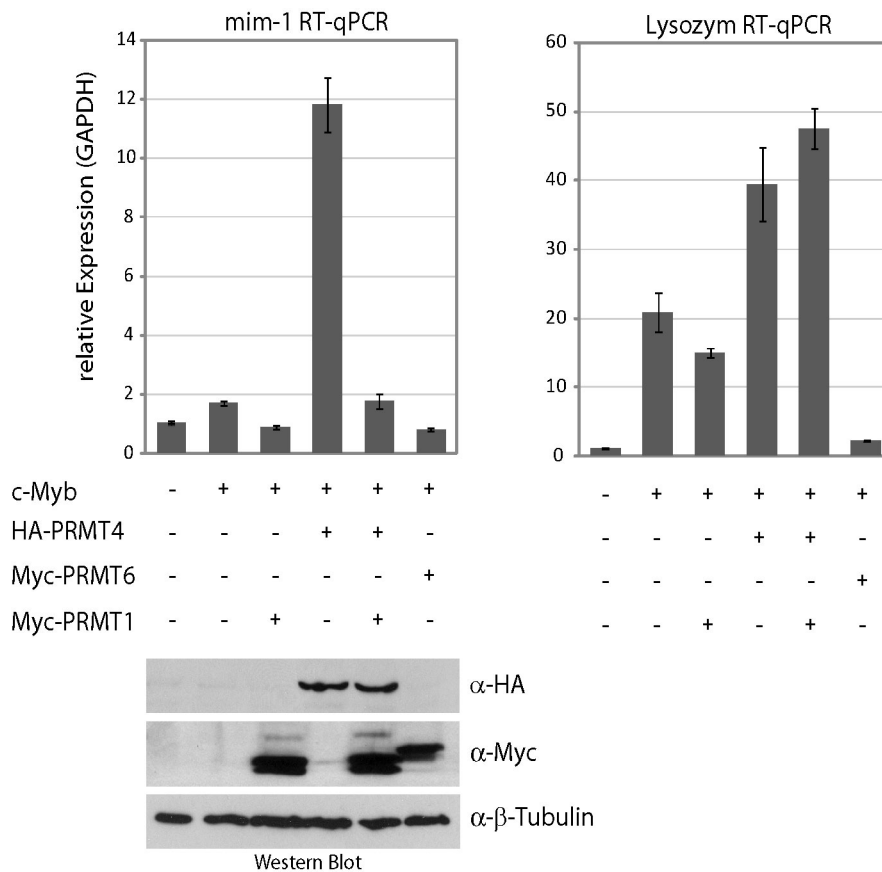


Abb. 32 Test verschiedener RRMTs in der c-Myb-abhängigen Genexpression

HD11-Zellen wurden mit 100 ng pcDNA3.1 m-c-Myb-Flag in Kombination mit 600 ng pcDNA3.1 hPRMT1-Myc, pcDNA3.1 hPRMT6-Myc oder pSG5 HA-PRMT4 in 6-wells transfiziert. Die DNA wurde mit Leervektor pcDNA3.1 und pSG5 auf 1,3 µg DNA aufgefüllt und die Ansätze mit Fugene transfiziert. Die Zellen wurden in IPH-Puffer lysiert oder in RNA-Lysepuffer geerntet und die Gesamt-RNA präpariert. Die Expressionsmengen von mim-1 und Lysozym wurden in der RT-qPCR relativ zu GAPDH ermittelt. Die basale Expression in der Levektorkontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Die Proteinexpression wurde mit α-Myc und α-HA-Färbung in der Western Blot-Analyse überprüft.

5.6.4. Auch das virale Oncogen v-Myb wird durch PRMT4 und Mi-2 coaktiviert

Die Vogelleukämieviren AMV und E26 transduzieren das virale Onkogen v-Myb und lösen myeloide und erythroide Leukämien in Vögeln aus. V-Myb ist eine mutierte Form des zellulären c-Myb. Neben Punktmutationen ist v-Myb in der N-terminalen DNA-Bindedomäne und in der C-terminalen negativen regulatorischen Domäne trunkiert. v-Myb und c-Myb unterscheiden sich teilweise in ihren Zielgenen aber auch in der Aktivierbarkeit durch Coaktivatoren (Ness et al. 1993; Liu et al. 2006).

In Abb. 33 wurde das virale v-Myb aus dem E26-Virus verwendet, um dessen Coaktivierung durch HA-PRMT4 und Flag-Mi-2α in HD11-Zellen zu untersuchen. Die Plasmide wurden in den angegebenen Kombinationen zu je gleichen Mengen transfiziert. Die Expression von HA-PRMT4 und Flag-Mi-2α wurde im Western Blot mit einer Flag- und einer PRMT4-Färbung

überprüft (Abb. 33 A). In der PRMT4-Färbung ist endogenes PRMT4 von HA-getagtem PRMT4 (*) durch die Laufhöhe zu unterscheiden. Als Anhaltspunkt für eine gleichmäßige Transfektion von v-Myb diente eine qPCR, da der α -c-Myb-Antikörper das virale v-Myb nicht erkannte (Abb. 33 B). Die Transfektion von v-Myb führte wie erwartet, zu einer Erhöhung der relativen Expression des mim-1-Gens. PRMT4 und Mi-2 α verstärkten jeweils einzeln die v-Myb-vermittelte Genexpression. Nach Transfektion beider Coaktivatoren zusammen mit c-Myb erfolgte eine kooperative Verstärkung der v-Myb-vermittelten Genexpression (Abb. 33 A).

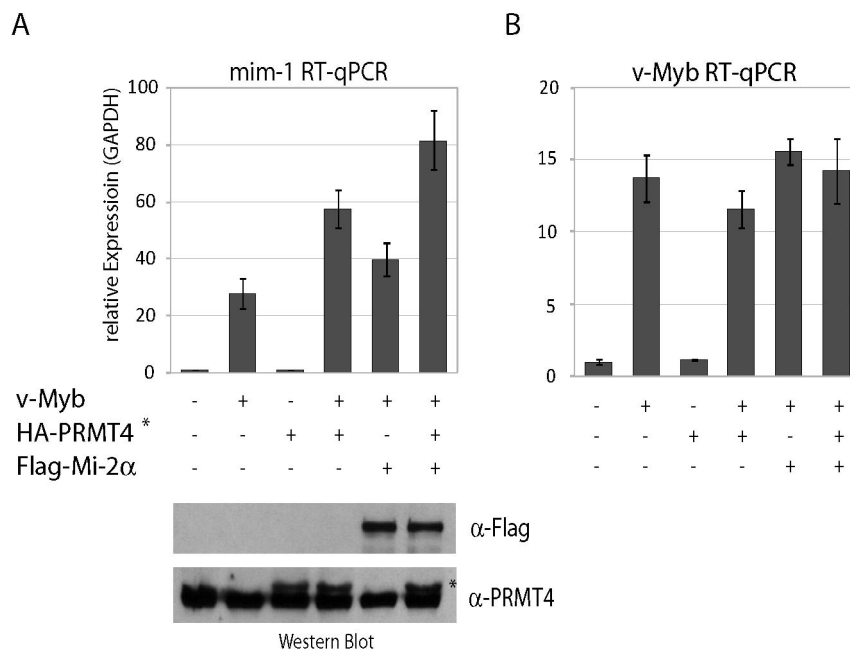


Abb. 33 Aktivierung der v-Myb-vermittelten Transkription durch PRMT4 und Mi-2

HD11-Zellen wurden mit gleichen Mengen pcDE26 v-Myb, pCI Flag-Mi-2 α und pSG5 HA-PRMT4 in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Es wurde mit pCDNA3 oder pSG5HA Leervektor aufgefüllt. Die Zellen wurden in IPH-Puffer und RNA-Lysepuffer zur Präparation von Gesamt-RNA geerntet. **A.** Die Transkriptmengen von mim-1 wurden in der RT-qPCR analysiert und relativ zur GAPDH-Expression standardisiert. Die basale Expression der Leervektorkontrolle wurde 1 gesetzt. Die Proteinexpression wurde mit α -Flag und α -PRMT4-Färbung in der Western Blot-Analyse überprüft. **B.** Die Transkriptmengen von v-Myb wurde in der RT-qPCR analysiert.

5.6.5. Der Enhancer und Promotor von mim-1 werden durch PRMT4 und Mi-2 aktiviert

Für die Myb-abhängige Expression von mim-1 sind die Myb-Bindestellen im Promotorbereich und in einem -2 kbp stromaufwärts gelegenen Enhancer wichtig (Chayka et al. 2005). Es ist daher interessant zu untersuchen, ob der Promotor, der Enhancer oder der Promotor und Enhancer zusammen die transkriptionelle Coaktivierung von mim-1 durch PRMT4 und Mi-2 vermitteln.

Die Luciferaseaktivität der Reporterkonstrukte, die den Promotor, den Enhancer oder eine Fusion von Promotor und Enhancer des mim-1-Gens enthielten (Abb. 34 A), wurden nach Transfektion von Expressionskonstrukten für c-Myb, PRMT4 und Mi-2 α in den angegebenen Kombinationen in HD11-Zellen untersucht (Abb. 34 B). Wie zuvor in der Literatur beschrieben war, wurde das Enhancerkonstrukt durch c-Myb stärker aktiviert als das Promotorkonstrukt. Die Luciferaseaktivität wird erheblich durch die Fusion von Enhancer und Promotor gesteigert. Die zuvor für das endogene mim-1-Gen beobachtete individuelle und kooperative transkriptionelle Coaktivierung durch PRMT4 und Mi-2 α ist für das Enhancer- und Promotorkonstrukt ebenfalls zu beobachten. Dabei wird das Enhancerkonstrukt jedoch schwächer durch PRMT4 und Mi-2 α coaktiviert als das Promotorkonstrukt (Abb. 34 B). Die Luciferaseaktivität der Fusion von Enhancer und Promotor wird wie auch das Promotorkonstrukt durch die einzelnen Coaktivatoren 2-fach und durch beide Coaktivatoren zusammen 3- bis 4-fach verstärkt. Es lässt sich schlussfolgern, dass für eine effiziente Aktivierung der Transkription von mim-1 sowohl der Promotor als auch der Enhancer nötig ist. Die Kooperation von PRMT4 und Mi-2 findet dabei eher am Promotor als am Enhancer statt.

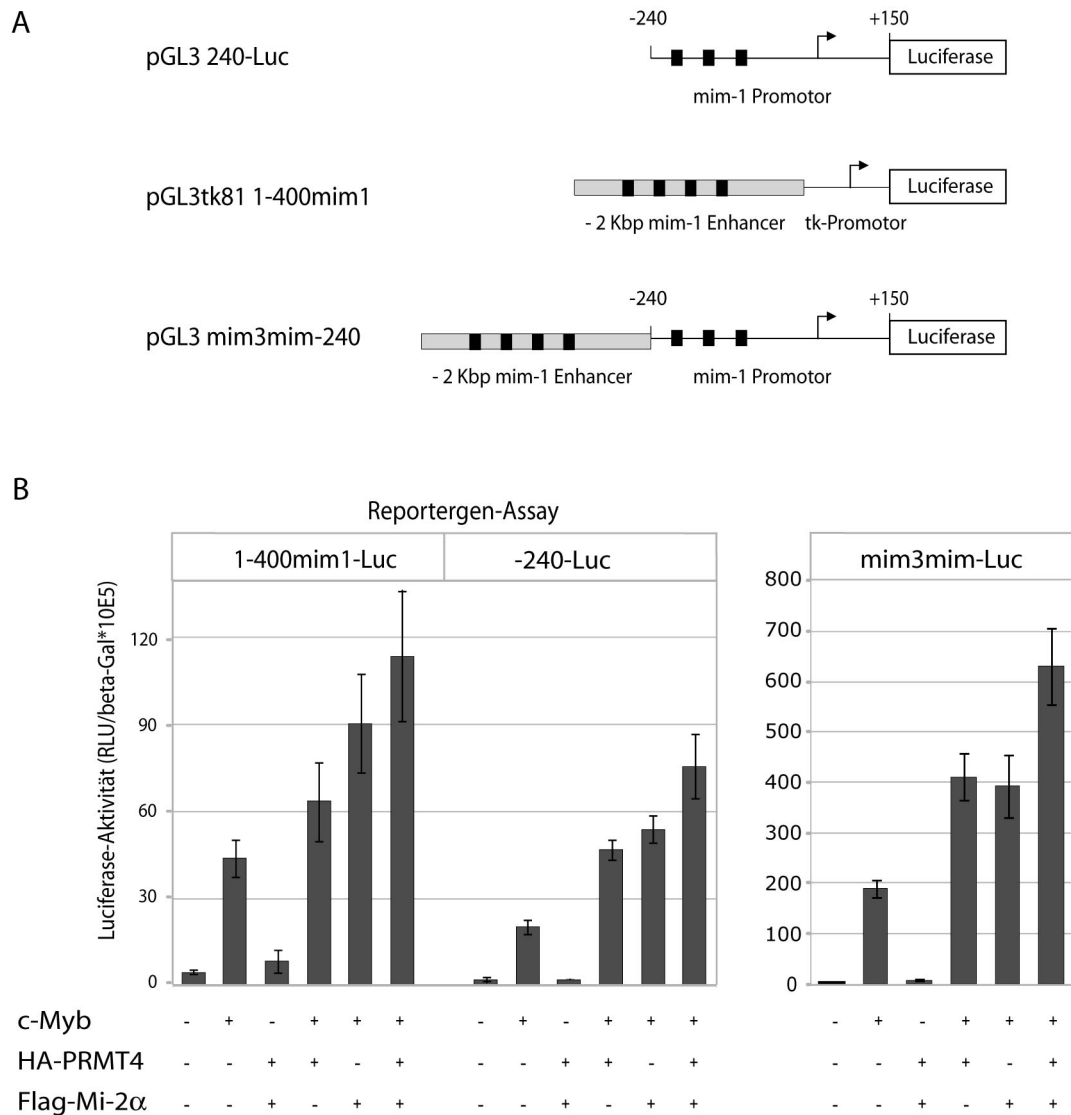


Abb. 34 Reportergen-Assay des mim-1 Promotors und Enhancers

A. Schematische Darstellung der mim-1-Reporterkonstrukte. Alle Fragmente wurden vor ein Luciferase-Reportergen kloniert. pGL3 240-Luc enthält das mim-1-Promotorfragment von -240 bis +150 bp, pGL2tk81 1-400mim-1 den -2 kbp stromaufwärts gelegene mim-1-Enhancer vor dem Promotor der Thymidinkinase, pGL2 mim3mim-240 den mim-1-Enhancer fusioniert mit dem mim-1-Promotorfragment. Myb-Bindestellen (■) **B.** HD11-Zellen wurden mit 400 ng mim-1-Reporterkonstrukt, 380 ng β-Gal, 20 ng pcDNA3.1 m-c-Myb-Flag, 600 ng pSG5 HA-PRMT4, 600 ng pCI Flag-Mi-2α, oder mit pcDNA3 und pSG5 Leervektor mittels Calciumphosphat in 24-wells in Triplikaten transfiziert. Die Luciferaseaktivität wurde relativ zur β-Galaktosidaseaktivität berechnet.

5.6.6. PRMT4 und Mi-2 coaktivieren ein c-Myb-abhängiges Reportergen in HEK293 Zellen

In diesem Experiment wurde untersucht, ob die c-Myb-abhängige Aktivität eines weiteren Reporterkonstrukts in einem alternativen Zellsystem durch PRMT4 und Mi-2 beeinflusst werden kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Promotor des TRHR (*Thyrotropin-Releasing-Hormone-Rezeptor*)-Gens durch c-Myb aktiviert werden kann (Matre et al. 2003). Daher wurde in HEK293-Zellen die Reporteraktivität des TRHR-Promotors nach Transfektion

mit den Expressionskonstrukten für c-Myb, PRMT4 und Mi-2 α in den angegebenen Kombinationen untersucht (Abb. 35). PRMT4 und Mi-2 α waren in Abwesenheit von c-Myb nicht in der Lage das Reporterkonstrukt zu aktivieren. Die c-Myb-vermittelte Aktivierung des Reporterkonstruktes wurde durch eine Coexpression von PRMT4 oder Mi-2 α leicht verstärkt. Die Transfektion beider Coaktivatoren hatte eine weitere Steigerung der Reporteraktivität zur Folge. Tendenziell ist also auch der TRHR-Promotor c-Myb-abhängig durch PRMT4 und Mi-2 α kooperativ aktivierbar (Abb. 35).

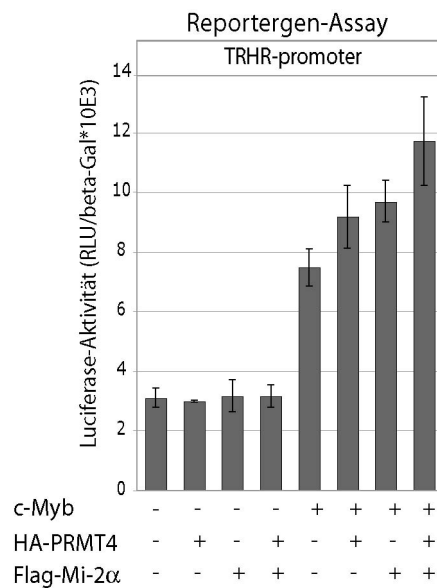


Abb. 35 Aktivierung des TRHR-Reportergens durch c-Myb, PRMT4 und Mi-2 α

HEK293-Zellen wurden mit 400 ng pGL2b-TRHR-1250, 380 ng β -Gal, 20 ng pcDNA3.1 m-c-Myb-Flag, 400 ng pSG5 HA-PRMT4, 400 ng pCI Flag-Mi-2 α , oder mit pcDNA3 und pSG5 Leervektor mittels Calciumphosphat in 24-wells in Triplikaten transfiziert und nach 2 Tagen geerntet. Die Luciferaseaktivität wurde relativ zur β -Galaktosidaseaktivität berechnet.

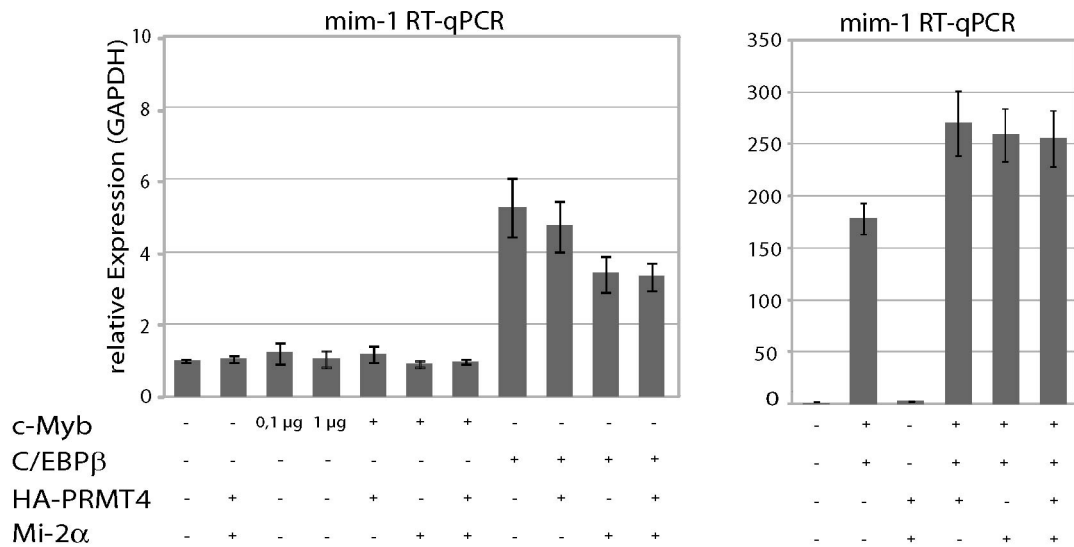
5.6.7. In Fibroblasten kann C/EBP β nicht durch PRMT4 oder Mi-2 transkriptionell aktiviert werden

Obwohl c-Myb in unreifen myeloiden, erythroiden und lymphoiden Zellen exprimiert wird, ist das mim-1-Gen nur in Promyelocyten exprimiert. Die Beschränkung der mim-1-Expression auf diesen Zelltyp wurde der synergistischen Kooperation mit Mitgliedern der C/EBP-Familie, insbesondere C/EBP β , zugeschrieben. Die ektopische Expression von Myb mit C/EBP β erlaubt eine Transkription von mim-1 in nicht-myeloiden Zellen, wie der Hühnchen-Fibroblastenzelllinie QT6 (Burk et al. 1993; Ness et al. 1993). Diese Zelllinie ist defizient für die Expression von C/EBP β und c-Myb und ist daher geeignet die transkriptionelle Aktivität der Transkriptionsfaktoren C/EBP β und c-Myb getrennt und im Zusammenspiel zu untersuchen.

Um zu untersuchen, ob die in 5.6.1. beobachtete Coaktivierung der c-Myb-vermittelten Genexpression durch PRMT4 und Mi-2 auf eine Coaktivierung von C/EBP β zurückzuführen ist, wurden Transfektionsexperimente in QT6-Zellen durchgeführt und die mim-1-Genexpression in der RT-qPCR analysiert (Abb. 36 A). Im Vergleich zur Leervektorkontrolle war nach der Transfektion von c-Myb keine mim-1-Expression sichtbar. Die Transfektion von C/EBP β allein führte zu einem 5-fachen Anstieg der Transkriptmenge von mim-1. Die Cotransfektion der Coaktivatoren PRMT4 und Mi-2 α hatte auf die mim-1-Expression in den Ansätzen mit c-Myb oder C/EBP β alleine kaum eine Auswirkung. Aus der RT-qPCR für C/EBP β (Abb. 36 B) wird ersichtlich, dass ein Abfallen der mim-1-Transkriptmengen nach Cotransfektion der Coaktivatoren zusammen mit C/EBP β auf die verringerte Expression von C/EBP β unter diesen Bedingungen zurückzuführen sein könnte. Wurden C/EBP β und c-Myb zusammen ektopisch exprimiert, ist das mim-1-Gen über 150-fach induziert. Wurden dazu jeweils PRMT4 oder Mi-2 α cotransfiziert, steigt die mim-1-Expression etwas an. Jedoch führt eine gemeinsame Cotransfektion von PRMT4 und Mi-2 α im Gegensatz zu den Beobachtungen in HD11-Zellen zu keiner zusätzlichen kooperativen Verstärkung der mim-1-Transkription (Abb. 36 A).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der hier untersuchten Fibroblastenzelllinie QT6 die C/EBP β -vermittelte Transkription durch PRMT4 und Mi-2 α nicht coaktiviert wird. Für die Transkriptionsaktivierung von c-Myb und C/EBP β zusammen stellen PRMT4 und Mi-2 α nur schwache Coaktivatoren der mim-1-Transkription dar. Eine transkriptionelle Kooperation von PRMT4 und Mi-2 in der Transkriptionsaktivierung durch c-Myb und C/EBP zusammen wurde nicht beobachtet.

A



B

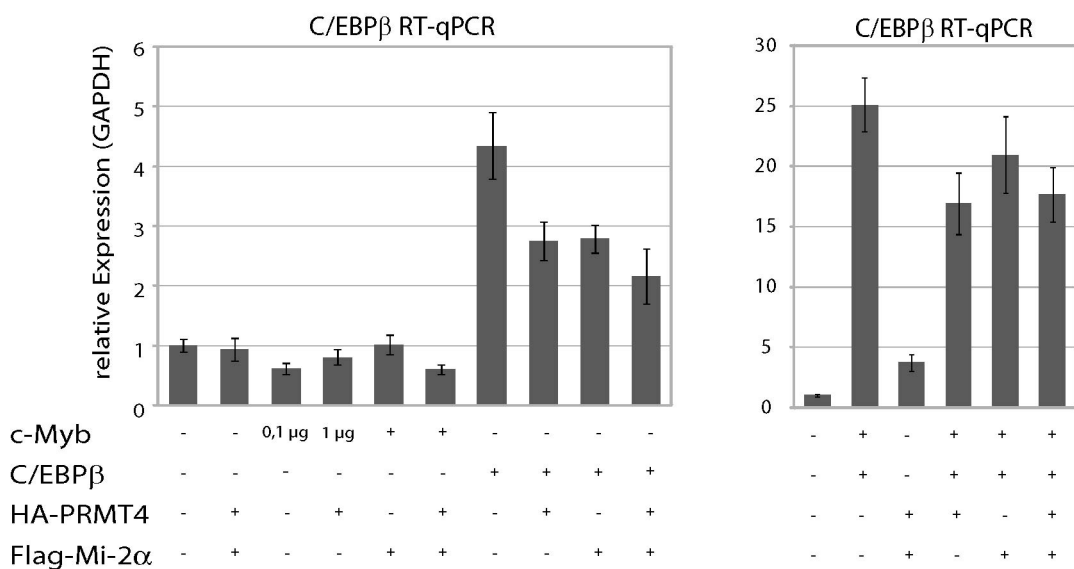


Abb. 36 Cotransfektion von C/EBPβ, c-Myb, PRMT4 und Mi-2α in Fibroblasten

A. u. B. QT-6-Zellen wurden in 6-wells mit 100 ng pcDNA3.1 m-c-Myb-Flag, 500 ng CEBPβ und 1 µg pSG5 HA-PRMT4, 1 µg pCI Flag-Mi-2α oder mit pCDNA3 und pSG5 Leervektor in den angegebenen Kombinationen mittels Calciumphosphat transfiziert und für die Präparation von Gesamt-RNA verwendet. Die Expressionsmengen von mim-1 (**A.**) und C/EBPβ (**B.**) wurden mittels RT-qPCR relativ zu GAPDH ermittelt. Die basale Expression der Leervektorkontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

5.7. PRMT4 und Mi-2 regulieren c-Myb-Zielgene in hämatopoetischen Zellen

5.7.1. c-Myb, PRMT4 und Mi-2 werden in hämatopoetischen Zellen exprimiert

Die Funktion von PRMT4 und Mi-2 auf die c-Myb-vermittelte Genexpression sollte nun in Zellen untersucht werden, in denen c-Myb biologisch relevant ist. Es ist bekannt, dass c-Myb einen wichtigen Regulator der Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen und der hämatopoetischen Differenzierung darstellt (Greig et al. 2008).

Daher wurde zunächst in hämatopoetischen Zelllinien, in denen eine Expression von c-Myb beschrieben war, die Expression von PRMT4 und Mi-2 auf Proteinebene überprüft (Jiang et al. 2006; Berge et al. 2007), (Abb. 37). Es wurden IPH-Lysate aus verschiedenen humanen Zelllinien generiert. Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293, die erythroleukämische Zelllinie K562, die promyelocytische Zelllinie HL-60 und die CD4+-positive leukämische T-Zelllinie Jurkat wurden im Western Blot hinsichtlich der Proteinexpression von Mi-2, c-Myb und PRMT4 analysiert. In vorhergehenden Experimenten konnte mit dem hier verwendeten Mi-2-Antikörper überexprimiertes Mi-2 β , jedoch kein Mi-2 α detektiert werden. Folglich wurde im Western Blot Mi-2 β in allen getesteten Zelllinien nachgewiesen (Abb. 37). Wie erwartet, ist der Transkriptionsfaktor c-Myb in den getesteten hämatopoetischen Zelllinien exprimiert. Es tritt eine starke Bande bei etwa 75 kDa und eine schwächere Bande bei 90 kDa auf. Dabei handelt es sich vermutlich eine kürzere und eine längere Isoform von c-Myb. In HEK293-Zellen hingegen ist kein c-Myb-Protein detektierbar. PRMT4 wird in allen getesteten Zelllinien exprimiert. Es wurden die zwei längsten Isoformen von PRMT4 im Western Blot nachgewiesen (Abb. 37).

Die hier untersuchten hämatopoetischen Zelllinien exprimieren sowohl c-Myb als auch PRMT4 und Mi-2. Die Zelllinie K562 wurde nun verwendet, um die Rolle von PRMT4 und Mi-2 in der transkriptionellen Regulation von c-Myb-Zielgenen sowie deren biologische Funktion zu untersuchen. Jurkat Zellen wurden bereits für die endogene CoIP zwischen PRMT4 und c-Myb herangezogen (Abb. 27 B).

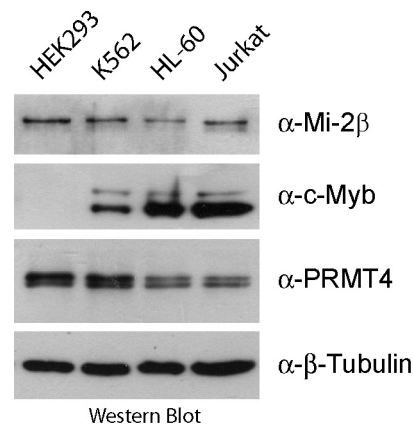


Abb. 37 Expression von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 in verschiedenen Zelllinien

Die Zelllinien HEK293, K562, HL-60 und Jurkat wurden in IPH-Puffer lysiert und mit Benzonase verdaut. Eine Proteinmenge von je 50 µg wurde je Probe aufgetragen, in einem SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Färbung erfolgte mit α-Mi-2 (1:500), α-Myb (1:1000); α-PRMT4 (1:1000) und α-β-Tubulin (1:5000).

5.7.2. Die Depletion von PRMT4 und Mi-2 führt zur Deregulation von c-Myb-Zielgenen

Der transkriptionelle Einfluss von PRMT4 und Mi-2 auf bekannte c-Myb-Zielgene sollte nun durch siRNA-vermittelte Depletion in K562-Zellen untersucht werden. Für hämatopoetische Zellen wurden c-Myb-Zielgene beschrieben, die an unterschiedlichen Funktionen der Zelle wie der Proliferation, der Differenzierung, das Zellüberleben oder an Stoffwechselprozessen beteiligt sind. Die Gene ADA (Adenosin Deaminase), MAT2A (Methionin Adenosyltransferase II, alpha), c-MYC und CCNB1 (CyclinB1) sind durch ChIP-Analysen in K562, Jurkat oder HL-60-Zellen als direkte Zielgene von c-Myb verifiziert worden (Berge et al. 2007; Nakata et al. 2007). Das Gen GATA3, das nach der positiven Selektion für die Differenzierung von T-Helferzellen wichtig ist, wurde in einer Thymomazelllinie mittels ChIP und EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) als direktes Zielgen von c-Myb identifiziert (Maurice et al. 2007). Die Gene NMU (Neuromedin U) und CDC7 wurden anhand einer induzierbaren, dominant negativen c-Myb-Mutante als mögliche c-Myb-Zielgene beschrieben (Shetzline et al. 2004).

Zunächst wurden K562-Zellen durch Elektroporation mit der Kontroll-siRNA siLuciferase (sictrl) und zwei alternativen siRNAs gegen PRMT4 (siPRMT4_1 und _2) transfiziert. Als Bestätigung der c-Myb-Abhängigkeit der zu untersuchenden Zielgene unter diesen experimentellen Bedingungen wurde c-Myb mit einem siRNA-Pool gegen c-Myb (siMyb-Pool) depletiert. Die Effizienz der *knockdowns* wurden mittels Western Blot-Färbung überprüft (Abb. 38 A). In K562-Zellen konnte eine effiziente Depletion von c-Myb und PRMT4

auf Proteinebene erreicht werden. Die Westen Blot-Färbung zeigt außerdem, dass die Proteinexpression von Mi-2 im *knockdown* von c-Myb und PRMT4 etwas schwächer ausfiel. Der Nachweis der Transkriptmengen von c-Myb und PRMT4 zeigte eine spezifische Reduktion der entsprechenden mRNA-Mengen in der RT-qPCR (Abb. 38 B). Die Transkriptmengen aller in Abb. 38 C aufgeführten Gene waren nach der Depletion von c-Myb reduziert. Es handelte sich daher tatsächlich um c-Myb regulierte Gene. Mit beiden alternativen siRNAs gegen PRMT4 konnte eine deutliche Reduktion der Transkriptmengen der Gene CDC7, CCNB1, c-MYC und GATA3 nachgewiesen werden. Die Depletion von PRMT4 hatte auf NMU keinen Einfluss. Für ADA und MAT2A war das Resultat nicht eindeutig, da sich siPRMT4_1 und _2 unterschiedlich verhielten.

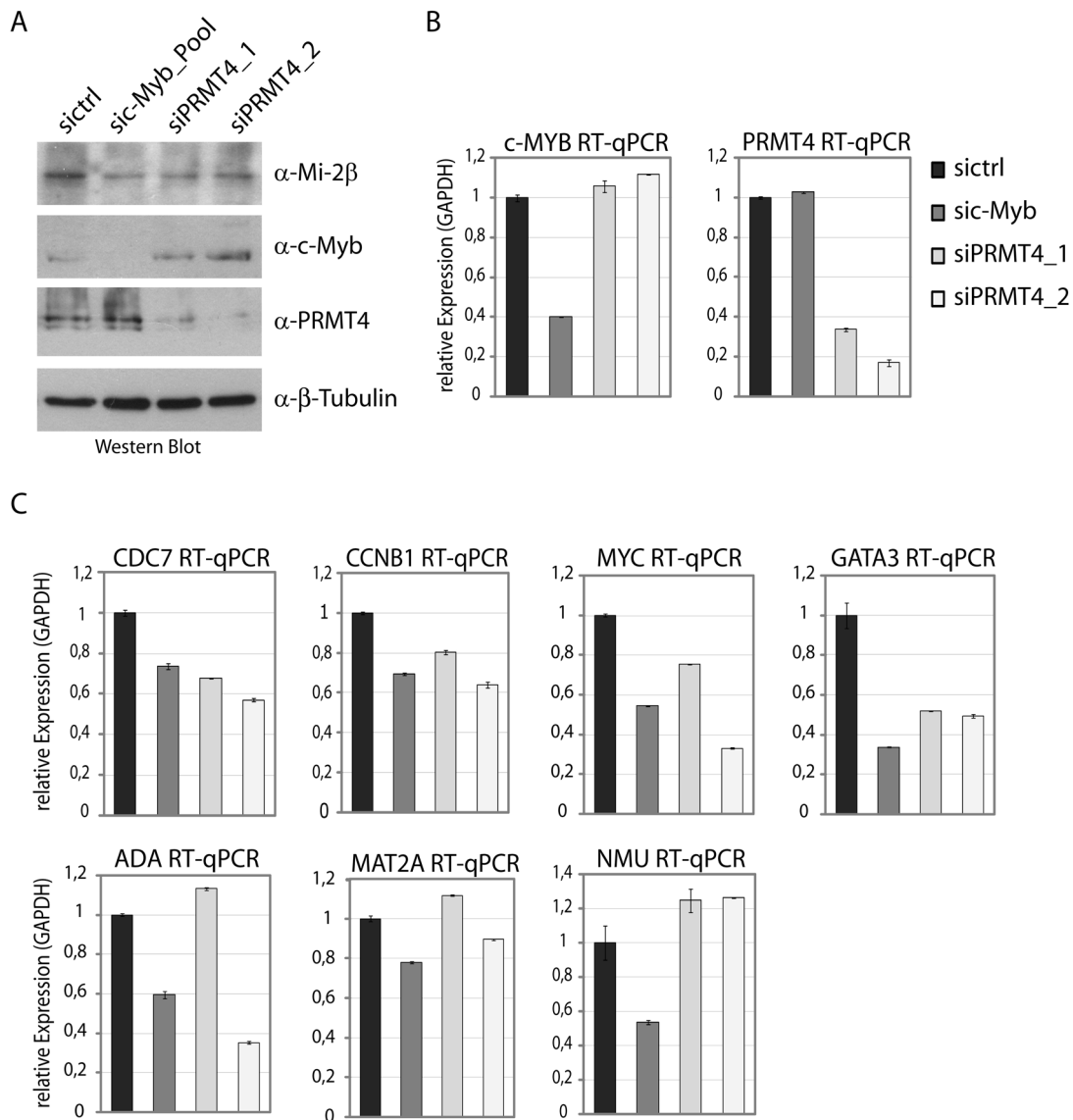


Abb. 38 Depletion von c-Myb und PRMT4 in K562-Zellen

5 x 10⁶ K562-Zellen wurden durch Elektroporation mit 6 μ g siRNA gegen PRMT4 (siRNA_1 und _2) und Myb (sic-Myb Dharmacon Pool) oder siLuciferase als Kontroll-siRNA (sictrl) transfiziert und in 8 ml Vollmedium aufgenommen. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion für die Präparation von RNA und Protein in IPH-Puffer geerntet. **A.** Je 25 μ g Protein wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die Färbung erfolgte mit α -Mi-2 (1:500), α -Myb (1:1000); α -PRMT4 (1:1000) und α - β -Tubulin (1:5000). **B. und C.** Die Transkriptmengen der aufgeführten Gene wurden mittels RT-qPCR analysiert. Die Expression wurde gegen die GAPDH-Expression standardisiert und die Transkriptmenge von sictrl gleich 1 gesetzt.

Im folgenden Experiment wurde der Einfluss von Mi-2 α und Mi-2 β auf c-Myb-Zielgene untersucht. K562-Zellen wurden mit je zwei alternativen siRNAs gegen Mi-2 α und Mi-2 β transfiziert. Die Depletion der Proteine wurde im Western Blot mit einer Färbung gegen Mi-2 und anhand der Transkriptmengen in der RT-qPCR analysiert (Abb. 39 A, B). Da der Antikörper gegen Mi-2 nur Mi-2 β und nicht Mi-2 α erkennt, wurde der *knockdown* von Mi-2 α

mittels RT-qPCR bestätigt (Abb. 39 B). Die Depletion von Mi-2 β war sowohl auf Proteinebene als auch anhand der Transkriptmengen nachweisbar (Abb. 39 B). Interessanterweise war die Transkriptmenge von Mi-2 α im *knockdown* von Mi-2 β hochreguliert. Die Proteinmengen von c-Myb blieben unter den spezifischen *knockdown*-Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle (sictrl) unverändert. Die Depletion von Mi-2 β bewirkte einen Verlust der Transkriptmenge von CDC7, c-MYC, GATA3, ADA und MAT2A. Im Gegensatz dazu waren die Gene NMU und CCNB1 hochreguliert. Die Depletion von Mi-2 α hatte eine schwächere Auswirkung auf die Transkription als Mi-2 β , dennoch waren die Tendenzen an einigen Zielgenen CDC7, CCNB1, GATA3 und NMU ähnlich (Abb. 39 C).

Es ist festzuhalten, dass eine Depletion von PRMT4 und Mi-2 eine transkriptionelle Deregulation c-Myb-abhängiger Gene zur Folge hat. Dabei wirkt PRMT4 als transkriptioneller Aktivator bzw. hat keinen Einfluss auf einige c-Myb-Zielgene. Mi-2 wirkt auf die Mehrzahl der getesteten Gene zwar aktivierend, hat im Gegensatz zu PRMT4 auf einige c-Myb-Zielgene jedoch eine repressorische Wirkung. Darüber hinaus zeigt der Vergleich der Depletion von Mi-2 α und Mi-2 β eine stärker deregulierende Wirkung durch Mi-2 β auf. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Zielgene CDC7, c-MYC und GATA3 durch PRMT4 und Mi-2 transkriptionell coaktiviert werden, CCNB1 wird hingegen durch PRMT4 transkriptionell aktiviert und durch Mi-2 reprimiert.

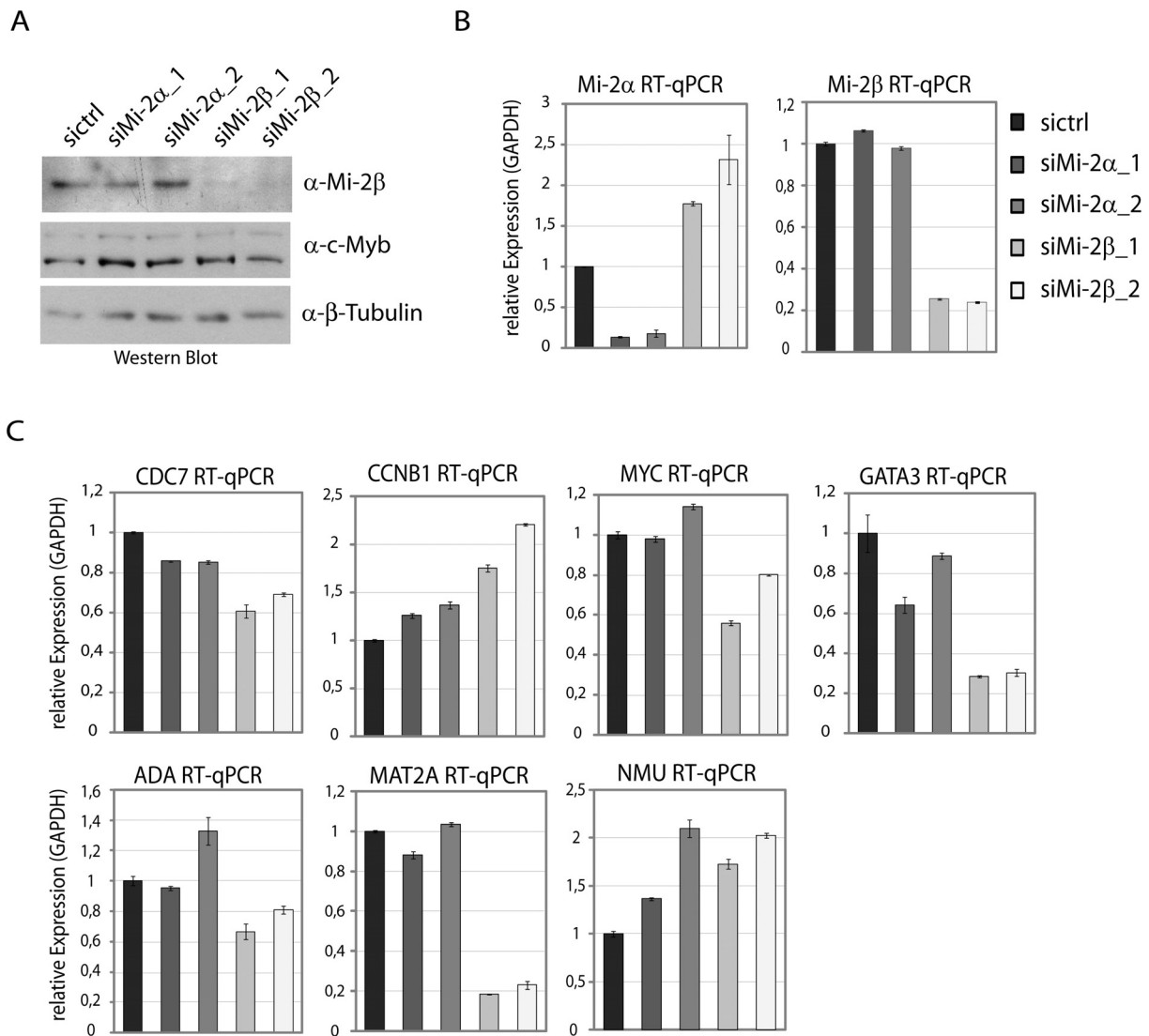


Abb. 39 Depletion von Mi-2 α und Mi-2 β in K562-Zellen

5 x 10⁶ K562-Zellen wurden durch Elektroporation mit 6 μ g siRNA gegen Mi-2 α und Mi-2 β (siRNA _1 und _2) oder siLuciferase als Kontroll-siRNA (sictrl) transfiziert und in 8 ml Vollmedium aufgenommen. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion für die Präparation von RNA und Protein in IPH-Puffer geerntet. **A.** Je 25 μ g Protein wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die Färbung erfolgte mit α -Mi-2 (1:500), α -Myb (1:1000) und α - β -Tubulin (1:5000). **B. und C.** Die Transkriptmengen der aufgeführten Gene wurden mittels RT-qPCR analysiert. Die Expression wurde gegen die GAPDH-Expression standardisiert und die Transkriptmenge von sictrl gleich 1 gesetzt.

5.7.3. PRMT4 und Mi-2 werden an die Promotoren c-Myb-abhängiger Gene rekrutiert

Um zu untersuchen, ob es sich bei der transkriptionellen Regulation c-Myb-abhängiger Zielgene durch PRMT4 und Mi-2 um eine direkte Regulation handelt, wurde die Rekrutierung dieser Faktoren an die Promotoren der Zielgene CDC7, c-MYC und CCNB1 mittels ChIP überprüft (Abb. 40). PRMT4 und Mi-2 regulieren die Transkription der Gene CDC7 und c-MYC positiv. Die Transkription von CCNB1 wird durch PRMT4 aktiviert und durch Mi-2 reprimiert.

Für die Gene CCNB1 und c-MYC wurden in der qPCR Promotorregionen amplifiziert, für die bereits in der Literatur eine Bindung von c-Myb beschrieben war (Berge et al. 2007; Nakata et al. 2007). Die Promotorregion von CDC7 wurde mit dem Programm MatInspector hinsichtlich potentieller c-Myb-Bindestellen untersucht. Die Primer wurden so entworfen, dass sie c-Myb-Bindestellen 600 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts von CDC7 amplifizierten. Als Kontrollregion wurde der Promotor des β -Tubulins gewählt, da dieser nicht durch c-Myb reguliert wird und keine c-Myb-Bindestellen enthält. In Abb. 40 ist die Rekrutierung von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 in Bezug auf den Kontrollantikörper IgG dargestellt. Im Vergleich zu β -Tubulin wurde der Transkriptionsfaktor c-Myb 4-fach stärker an den Promotor von CDC7 und 2-fach stärker an die Promotoren von c-MYC und CCNB1 gebunden. Es ist also festzuhalten, dass CDC7 neben c-MYC und CCNB1, die in der Literatur bereits als direkte Zielgene von c-Myb beschrieben waren, ebenfalls ein direktes Zielgen von c-Myb ist. PRMT4 wurde an alle der untersuchten c-Myb-Zielgene im Vergleich zu β -Tubulin mindestens 2-fach rekrutiert. Mi-2 wurde deutlich an die Promotoren von c-MYC und CDC7 gebunden. Eine Bindung von Mi-2 an den CCNB1-Promotor war nicht nachweisbar. Folglich wird die negative Regulation von CCNB1 durch Mi-2 nicht durch eine direkte Rekrutierung an die untersuchte Promotorregion vermittelt.

Zusammenfassend wurde in K562-Zellen der Nachweis erbracht, dass PRMT4 und Mi-2 c-Myb-abhängige Zielgene transkriptionell regulieren. Für zwei c-Myb-Zielgene, die durch PRMT4 und Mi-2 transkriptionell aktiviert werden, wurde eine Rekrutierung des Transkriptionsfaktors c-Myb und der Regulatoren PRMT4 und Mi-2 an die entsprechenden Promotorregionen gezeigt. Die Coaktivierung dieser c-Myb-Zielgene durch PRMT4 und Mi-2 erfolgt daher direkt und auf Promotorebene.

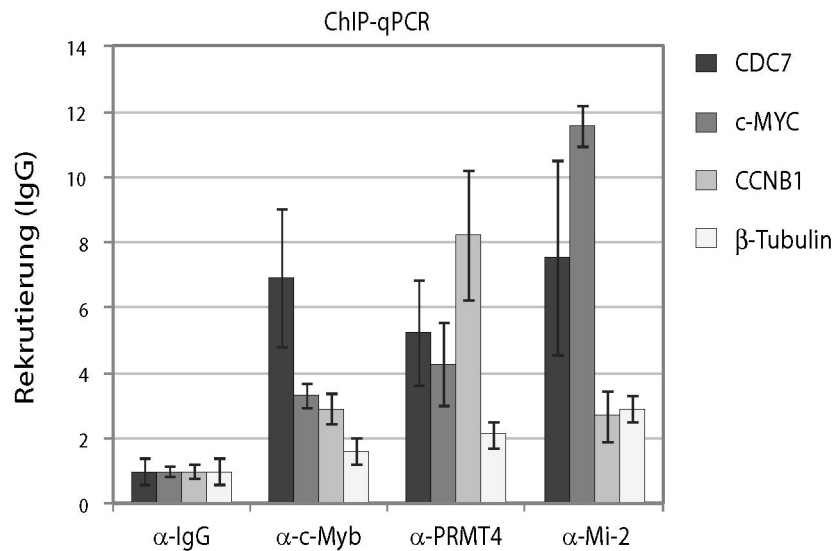


Abb. 40 Chromatinimmunpräzipitation von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 an c-Myb-Zielgenen

Ca. 1×10^7 K562-Zellen wurden in der ChIP pro IP verwendet. Das Crosslinking des Chromatins erfolgte für 20 Min mit 1% Formaldehyd. Das Chromatin wurde bei 30% Amplitude für $80 \times 1s$ in Lysepuffer II mit 0,4 % SDS sonifiziert. Etwa 150 µg Chromatin wurde mit 4 µg Kaninchen α-IgG, α-c-Myb Antikörper, α-Mi-2 und 30 µl α-PRMT4 präzipitiert. Die Analyse der aufgereinigten DNA erfolgte mittels qPCR in Triplikaten. Die verwendeten Primer umspannen c-Myb-Bindestellen in den Promotoren von CDC7, c-MYC, CCNB1 (Primer: CDC7-ChIP600up, c-MYC-ChIP600up, CCNB1-ChIP100up). Als Kontrollregion wurde eine Region des Promotors von β-Tubulin (β-Tubulin-ProChIP) amplifiziert. Die Rekrutierung wurde auf IgG bezogen.

5.8. c-Myb, PRMT4 und Mi-2 in der Regulation der Proliferation und des Zellzyklus

In hämatopoetischen Zellen ist das Protoonkogen c-Myb für den Erhalt der Proliferation wichtig und spielt in der Regulation des Zellzyklus eine Rolle (Oh and Reddy 1999). In einer Studie mit der erythroleukämischen Zelllinie K562 wurde gezeigt, dass die stabile Expression von degradationsresistentem c-Myb das Proliferationspotential der Zellen erhöht (Corradini et al. 2005). Weiterhin ist bekannt, dass eine stabile Expression von dominant negativem c-Myb zu kleineren Kolonien im Methylcellulose-Assay führt. Einige c-Myb-Zielgene, wie das Protoonkogen c-MYC und das für den G2/M-Übergang relevante CCNB1 sind mit der Regulation des Zellzyklus durch c-Myb in Verbindung gebracht worden (Nakagoshi et al. 1992; Schmidt et al. 2000; Nakata et al. 2007). In dieser Arbeit (Kapitel 5.7.2) wurden die zellzyklusrelevanten Gene CDC7, c-MYC und CCNB1 als c-Myb-Zielgene beschrieben, die durch PRMT4 und Mi-2 transkriptionell reguliert werden. Daher sollte nun der Einfluss von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 auf das Zellwachstum und den Zellzyklus untersucht werden.

5.8.1. c-Myb, PRMT4 und Mi-2 sind für die Proliferation von K562-Zellen in Methylcellulose wichtig

Um die biologische Funktion von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 zu untersuchen, wurden K562-Zellen für einen transienten *knockdown* mit siRNA-Pools gegen c-Myb, PRMT4, siMi-2 α und siMi-2 β transfiziert. Die Effizienz der Depletion von Mi-2 (Mi-2 β), c-Myb und PRMT4 auf Proteinebene wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 41). Die Proteinbanden in der Transfektion ohne siRNA sind im Vergleich zur Transfektion mit sictrl unbeeinflusst. Die verwendeten siRNA-Pools bewirkten einen effizienten und spezifischen *knockdown* von Mi-2 β , PRMT4 und c-Myb (Abb. 41 A). Die Depletion von Mi-2 α wurde wie zuvor mit RT-qPCR auf RNA-Ebene bestätigt (Daten nicht gezeigt).

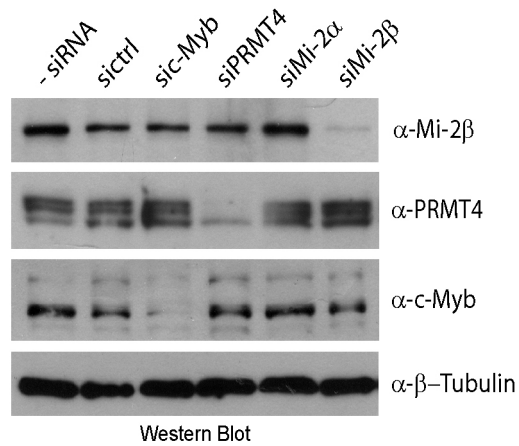


Abb. 41 Depletion von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 α und Mi-2 β in K562-Zellen

K562-Zellen wurden durch Elektroporation mit 6 μ g eines siRNA-Pools gegen c-Myb (Dharmacon), PRMT4 (Pool aus siPRMT4_1, 2 und _3), siMi-2 α (Pool aus siMi-2 α _1 und _2), siMi-2 β (Pool aus siMi-2 β _1 und _2) und mit Kontroll-siRNA (Pool aus siNON, siLuciferase und siscrambled) oder ohne siRNA mittels Elektroporation transfiziert und 72 h nach Transfektion in IPH-Puffer geerntet. Je 25 μ g Protein wurde pro Probe im Western Blot mit den Antikörpern α -Mi-2 (1:500), α -PRMT4 (1:500) und α -c-Myb (1:1000) und α - β -Tubulin (1:5000) analysiert.

Um das Wachstum der K562-Zellen unter diesen *knockdown*-Bedingungen in Flüssigkultur zu untersuchen, wurden die Zellen 60 Stunden nach der Transfektion ausgesät und täglich ausgezählt. Aus der Wachstumskurve in Abb. 42 A geht hervor, dass die Transfektion von sictrl im Vergleich zu einer Transfektion ohne siRNA keinen Einfluss auf das Zellwachstum hatte. In Abb. 42 B und C ist das Wachstum der Zellen im *knockdown* von c-Myb und PRMT4 bzw. Mi-2 α und Mi-2 β im Vergleich zur Kontroll-siRNA dargestellt. Das Wachstum in Flüssigkultur war durch einen transienten *knockdown* von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 α unbeeinflusst. Hingegen führte eine Depletion von Mi-2 β zu einem deutlichen Verlust der Proliferationsfähigkeit von K562-Zellen.

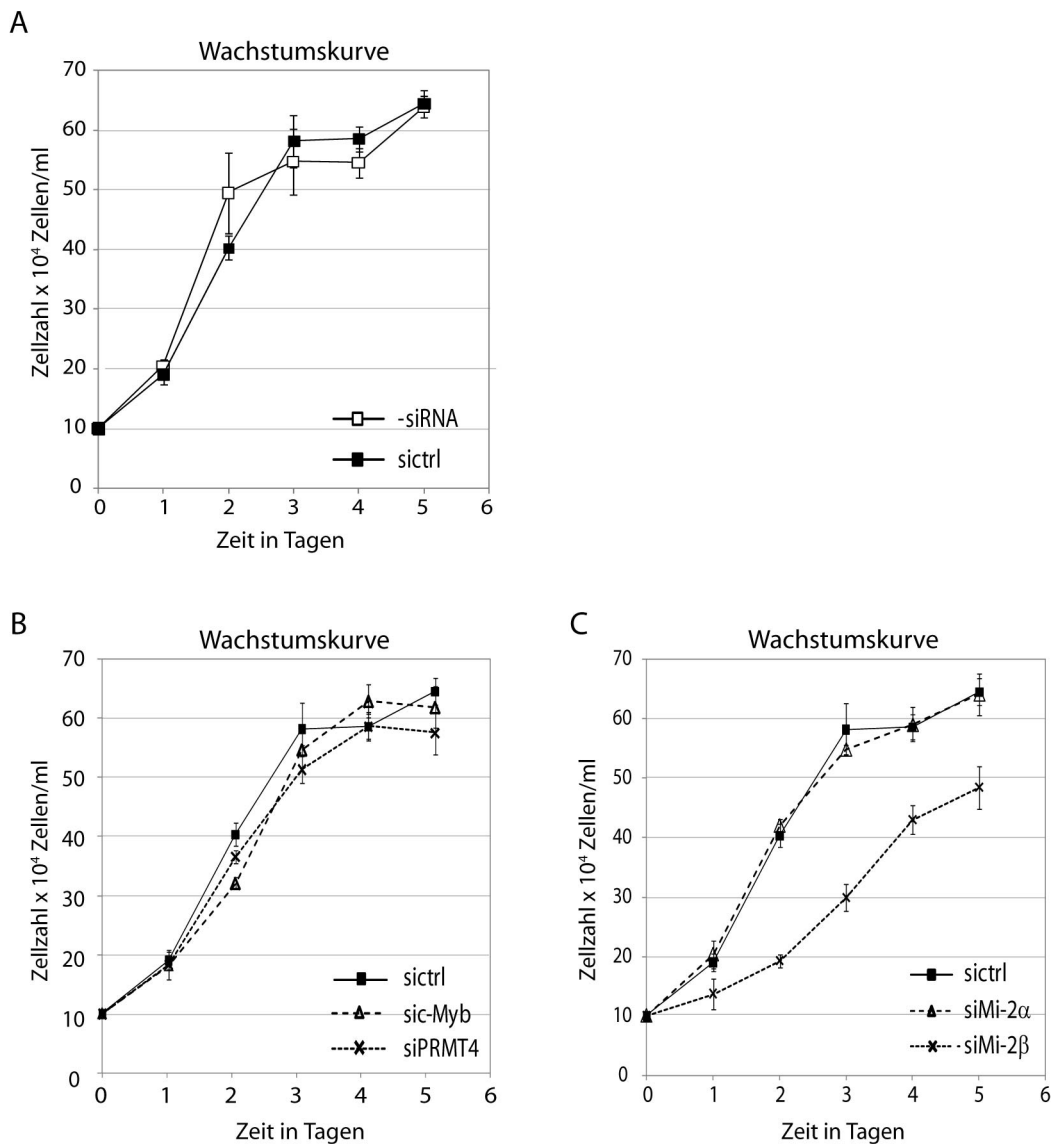


Abb. 42 Wachstum von K562-Zellen nach Depletion von c-Myb, PRMT4 und Mi-2α und Mi-2β

Die unter Abb. 41 transfizierten Zellen wurden 60 h nach Transfektion ausgezählt und zu je 1×10^4 Zellen/ml in 6-well Platten in Triplikaten in je 2 ml ausgesät. Die Zellen wurden täglich unter Ausschluss toter Zellen mit Trypanblau ausgezählt. **A.** Vergleich der Transfektion ohne siRNA mit sictrl. **B.** Vergleich sic-Myb und siPRMT4 mit sictrl. **C.** Vergleich siMi-2α mit siMi-2β mit sictrl.

Ein Maß für die Transformation von Zellen ist ihre Fähigkeit in Methylcellulose zu proliferieren und Kolonien zu bilden. Um das Wachstum von K562-Zellen unter den bereits genannten *knockdown*-Bedingungen zu untersuchen, wurden die mit siRNAs transfizierten K562-Zellen in Methylcellulose ausgesät. Die Kolonien wurden mit dem Farbstoff INT angefärbt (Abb. 43 A). Die Anzahl der Kolonien mit einer Größe von mindestens 0,1 mm aus drei unabhängigen Experimenten wurde quantifiziert (Abb. 43 B). Die Depletion von c-Myb bzw. PRMT4 bewirkte eine Reduktion der Koloniebildung um ca. 25-30 %. Die Depletion von Mi-2α führt zu einem Verlust von etwa 10-15 % der Kolonien. Wie zuvor bei den

Wachstumskurven in Flüssigkultur beobachtet werden konnte (Abb. 41 C), hat der *knockdown* von Mi-2 β den stärksten Effekt auf die Proliferationsfähigkeit von K562-Zellen. Im Vergleich zu den Kontrolltransfektionen wurden etwa 70 % weniger Kolonien gebildet.

Anhand der in diesem Kapitel durchgeführten Proliferations-Assays stellte sich heraus, dass bezüglich der Koloniebildung in Methylcellulose eine Korrelation der Funktion von c-Myb, PRMT4, Mi-2 α und Mi-2 β vorliegt. Mi-2 β scheint dabei ein essentieller Faktor für die Proliferation zu sein, da im *knockdown* von Mi-2 β das Wachstum in Suspension und in Methylcellulose stark verringert ist.

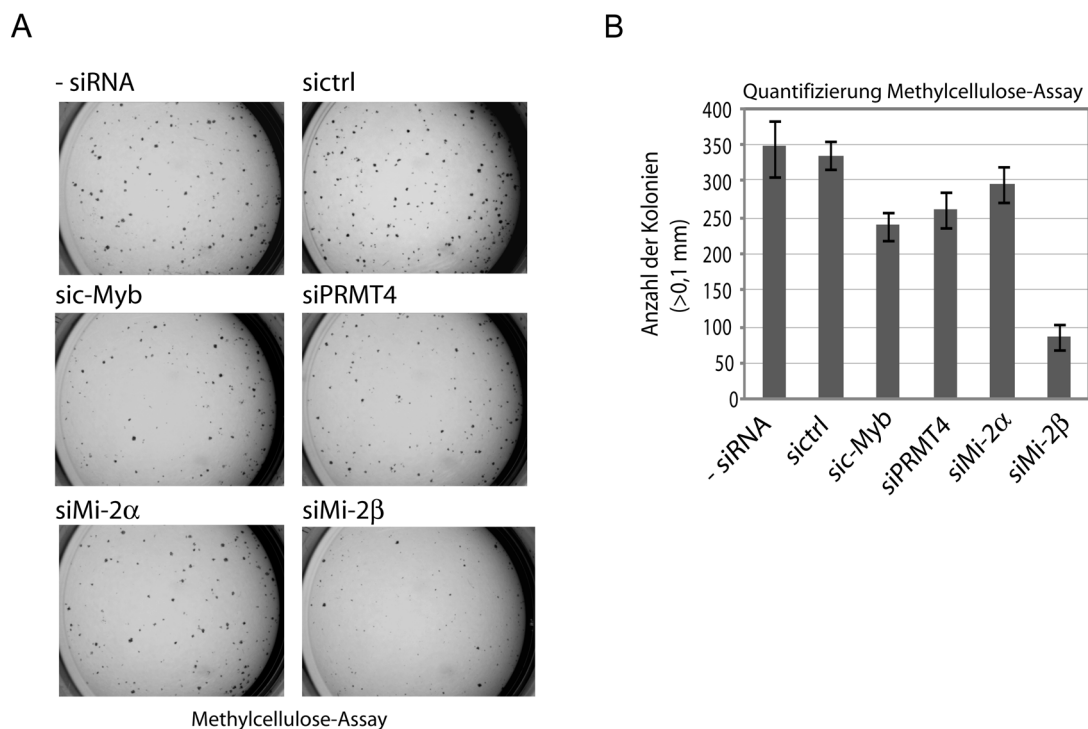


Abb. 43 Wachstum von K562-Zellen in Methylcellulose

Die unter Abb. 41 transfizierten Zellen wurden 72 h nach Transfektion ausgezählt, je 800 Zellen in 100 μ l Medium zu je 300 μ l Methylcellulose gegeben und in 24-well-Platten gegeben. Pro *knockdown*-Bedingung wurden Duplikate ausgesät. Nach zwei Tagen Inkubation der Platten im Brutschrank bei 37°C wurde zur Anfärbung der Zellen je 50 μ l des Farbstoffes INT (1 mg/ml) vorsichtig auf die Vertiefungen gegeben und weitere 5 Tage inkubiert. **A.** Koloniebildung von K562-Zellen unter den *knockdown*-Bedingungen -siRNA, sictrl, sic-Myb, siPRMT4, siMi-2 α , siMi-2 β **B.** Kolonien mit einer Größe < 0,1 mm der Duplikate aus drei Experimenten wurden ausgezählt.

5.8.2. c-Myb, PRMT4 und Mi-2 korrelieren in der Regulation des Zellzyklus

Aus der Literatur ist bekannt, dass c-Myb in K562-Zellen an der Transition der G2/M-Phase beteiligt ist (Nakata et al. 2007). Im folgenden Kapitel wurde der Zellzyklusstatus von K562-Zellen im *knockdown* von c-Myb, PRMT4, Mi-2 α und Mi-2 β mit einer Propidiumiodid-Färbung im Durchflusszytometer analysiert. Die Zellen wurden wie in Abb. 41 transfiziert und drei Tage später für eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) verwendet. Die Färbung mit PI erlaubt eine Quantifizierung der Anzahl der Zellen, die sich in der G1- oder G2/M-Phase befinden. Abb. 44 A zeigt die Zellzyklusprofile unter den spezifischen *knockdown*-Bedingungen zusammen mit den prozentualen Anteilen der Zellen in der G1- und G2/M-Phase. Die Veränderung der Zellzyklusverteilung nach spezifischem *knockdown* in Bezug auf die Kontrolltransfektion sictrl sind in Abb. 44 B dargestellt. Das Zellzyklusprofil der Transfektion ohne siRNA unterschied sich nicht von der Transfektion mit sictrl. Im *knockdown* von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 α war der Anteil der Zellen in der G1-Phase um ca. 4 - 6 % verringert. Im *knockdown* von Mi-2 β war die G1-Phase um 15 % reduziert. Der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase nahm um 4 - 6 % zu, wenn c-Myb, PRMT4 und Mi-2 α depletiert waren. Im Falle des *knockdowns* von Mi-2 β stieg der Anteil in der G2/M-Phase um 10 % an.

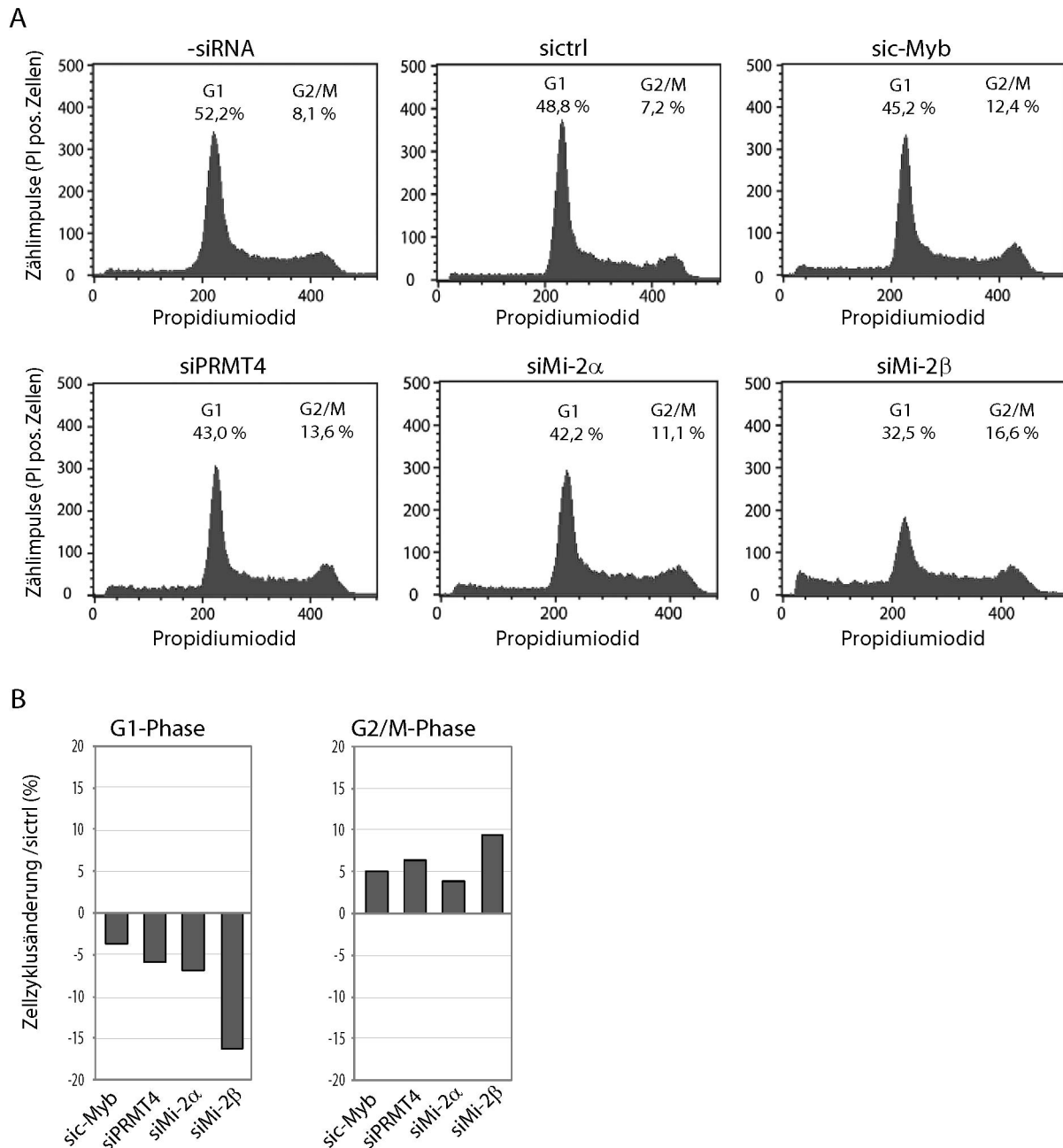


Abb. 44 Zellzyklusanalyse nach Depletion von c-Myb, PRMT4 und Mi-2

K562-Zellen wurden mit siRNA wie unter Abb. 41 transfiziert. 1×10^6 exponentiell wachsende Zellen wurden drei Tage nach Transfektion in Ethanol fixiert. Nach der Propidiumiodidfärbung wurde das PI-Signal im Durchflusszytometer mit dem FL2-A-Kanal in linearer Skalierung bei langsamer Fließgeschwindigkeit mit dem Programm CellQuestPro vermessen. Es wurden insgesamt 10 000 Zellen pro Probe detektiert. **A.** Darstellung der Zellzyklusprofile (PI-Signal gegen Zählimpulse) der *knockdown*-Bedingungen -siRNA, sictrl, sic-Myb, siPRMT4, siMi-2 α und siMi-2 β . Die Quantifizierung des prozentualen Anteils der G1- und G2/M-Phase am Gesamtzellzyklus (G1-, S-, G2/M-Phase) erfolgte mit dem Programm ModFit. **B.** Die Zellzyklusänderung (Differenz) relativ zu sictrl ist dargestellt.

Neben der Quantifizierung der G1- und G2/M-Phase erlaubt die PI-Färbung außerdem die Bestimmung des Anteils der Zellen, die im Sub-G1 vorliegen. Der Sub-G1 ist ein Maß für die

Apoptose in einer Zellpopulation. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm CellQuestPro (Abb. 45). Nach Transfektion von sictrl befanden sich ca. 8 % der Zellen im Sub-G1. Der *knockdown* von c-Myb bewirkte einen leichten Anstieg des Sub-G1 um etwa 3 - 4 % im Vergleich zu sictrl. Eine Zunahme des Sub-G1 um etwa 7 % war im *knockdown* von PRMT4 und Mi-2 α festzustellen. Der Verlust von Mi-2 β bewirkte im Vergleich zu sictrl eine 3-fache Zunahme der Zellen im Sub-G1 auf 25 % (Abb. 45).

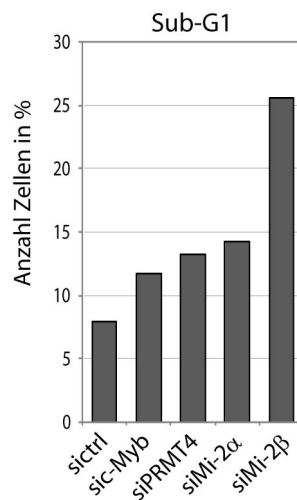


Abb. 45 Bestimmung des Sub-G1-Anteils

Die Zellzyklusprofile wurden hinsichtlich des Sub-G1-Anteils mit dem Programm CellQuestPro ausgewertet. Die Anzahl der Zellen im Sub-G1 in Prozent für die *knockdown*-Bedingungen sictrl, si-c-Myb, siPRMT4, siMi-2 α und siMi-2 β ist dargestellt.

Die Faktoren c-Myb, PRMT4, Mi-2 α und Mi-2 β beeinflussen den Zellzyklus auf ähnliche Weise, da ihr *knockdown* jeweils zu einem Arrest in der G2/M-Phase führt. Der größte Effekt auf den Zellzyklus erfolgt nach Depletion von Mi-2 β . Dies stimmt gut mit dem deutlichen Verlust in der Proliferation überein. Insgesamt korreliert der hier beobachtete Einfluss von c-Myb, PRMT4, Mi-2 α oder Mi-2 β auf den Zellzyklus mit den zuvor beobachteten Wachstumseffekten (Kapitel 5.8.1.).

5.9. Die Funktion von PRMT4 und Mi-2 in der Differenzierung hämatopoetischer Zellen

Aus einer Studie von c-Myb *knockout*-Mäusen ist eine essentielle Rolle für c-Myb in der Hämatopoese bekannt (Mucenski et al. 1991). C-Myb ist dabei für den Erhalt des proliferativen Progenitorstatus notwendig und wird dementsprechend in myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen exprimiert. Während der zunehmenden Differenzierung hämatopoetischer Zellen wird c-Myb herunterreguliert (Westin et al. 1982; Oh and Reddy 1999; Slany 2005; Greig et al. 2008). Die erythroleukämische Zelllinie K562 ist ein gut etabliertes Zellsystem zur Untersuchung der zellulären Differenzierung. Diese Zellen haben das Potential durch Stimulation mit verschiedenen Reagenzien in die erythroide oder die megakaryozytische Linie zu differenzieren (Rowley et al. 1981; Leary et al. 1987). Eine konstitutive Expression von c-Myb blockiert die Differenzierung in die erythroide Linie, verhindert jedoch nicht die megakaryozytische Differenzierung (Rosson and O'Brien 1995).

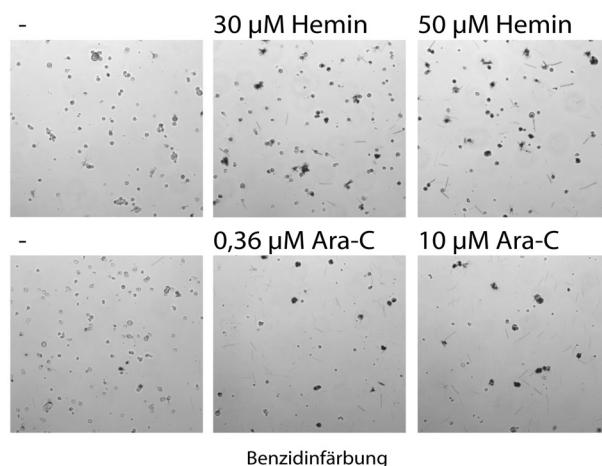
5.9.1. c-Myb, PRMT4 und Mi-2 werden mit der voranschreitenden erythroiden Differenzierung herunterreguliert

Die durch die Reagenzien Hemin und Ara-C induzierte erythroide Differenzierung von K562-Zellen geht mit einer Reduktion der Transkriptmengen von c-Myb einher (Eisbruch et al. 1988; Sasaki et al. 1994). Im Falle der Ara-C-Behandlung wurde eine verringerte Proteinexpression von c-Myb gezeigt (Rosson and O'Brien 1995).

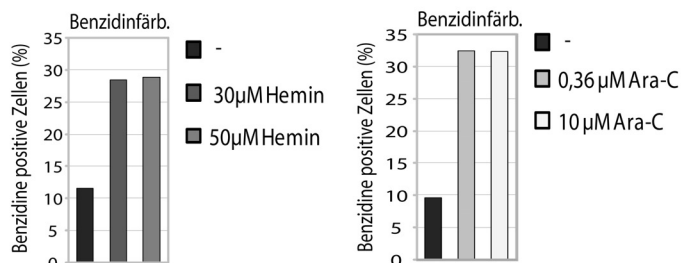
Im Folgenden wurde die erythroide Differenzierung von K562-Zellen durch Hemin und Ara-C induziert und die Transkript- und Proteinmengen von PRMT4, Mi-2 α und Mi-2 β während der Differenzierung untersucht. Die Differenzierung in die erythroide Linie geht mit der Induktion von Globingenen einher, deren Genprodukte dann zur Bildung von Hämoglobin zu Verfügung stehen (Dean et al. 1983; Sasaki et al. 1994; Jia et al. 2002). Mit einer Benzidinfärbung erfolgte der Nachweis des Hämoglobins als Differenzierungsmarker, wobei differenzierte Zellen schwarz angefärbt wurden (Abb. 46 A). Anhand der Zelldichte in den Ara-C-behandelten Proben war zu erkennen, dass das Zytostatika Ara-C schon bei 0,36 μ M auf das Wachstum von K562-Zellen inhibitorisch wirkte. Der hohe Anteil an Zelldebris in diesen Proben erschwerte die Auswertung der Benzidinfärbung. Zur Quantifizierung der benzidinpositiven Zellen wurde der Anteil gefärbter Zellen in Prozent berechnet (Abb. 46 B). Etwa 10 % der Zellen differenzierten spontan unter normalen Wachstumsbedingungen. Mit beiden Reagenzien wurde eine Differenzierung von etwa 30 % der Zellen beobachtet. Mit

höheren Konzentrationen Hemin und Ara-C wurde keine weitere Steigerung des Anteils differenzierter Zellen erreicht. Zur weiteren Kontrolle der Differenzierung wurde die Transkriptmenge des γ -Globingens mit RT-qPCR analysiert (Abb. 46 C). Die relative Expression von γ -Globin war nach der Ara-C-Behandlung höher als nach der Behandlung mit Hemin. Die transkriptionelle Induktion von γ -Globin und die Benzidinfärbung bestätigen, dass in diesem experimentellen Aufbau eine erythroide Differenzierung von K562-Zellen erreicht wurde.

A



B



C

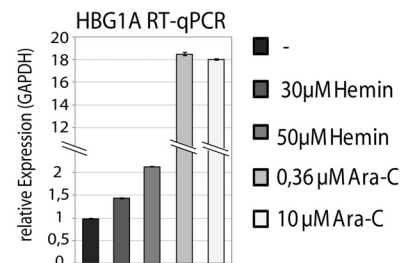


Abb. 46 Differenzierung von K562-Zellen mit Hemin und Ara-C

Exponentiell wachsende K562-Zellen wurden für drei Tage mit 30 und 50 μ M Hemin oder für 5 Tage mit 0,36 und 10 μ M Ara-C behandelt. Der Nachweis der Differenzierung erfolgte mit 0,1 %iger 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid (TMB)-Lösung (Benzidinfärbung) **A.** Ablichtung der Benzidinfärbung von K562-Zellen. **B.** Quantifizierung der Benzidin-gefärbten Zellen. Es wurde je Probe mindestens 300 Zellen gezählt und der Anteil benzidinpositiver Zellen in % berechnet. **C.** Undifferenzierte und mit Hemin oder Ara-C behandelte Zellen wurden für die Präparation von Gesamt-RNA verwendet. Die Transkriptmenge von HBG1A wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Die Expression wurde gegen die GAPDH-Expression standardisiert und die Expression der behandelten Proben auf die unbehandelte Probe bezogen.

Die Expression von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 während der erythroiden Differenzierung wurde nun anhand des Nachweises der Proteinexpression (Abb. 47 A) und der Transkriptmengen

(Abb. 47 B) untersucht. Wie erwartet, bewirkte die Induktion der Differenzierung von K562-Zellen mit Ara-C eine Verringerung der Expression von c-Myb auf Transkriptions- und Proteinebene. Hemin bewirkte unter den getesteten Bedingungen einen weniger starken Verlust von c-Myb als Ara-C. Der Proteinnachweis von Mi-2 zeigte eine Reduktion der Proteinexpression von Mi-2 mit 50 μ M Hemin und beiden Ara-C-Konzentrationen. PRMT4 war auf Proteinebene durch Hemin unbeeinflusst, wurde jedoch nach der Behandlung mit Ara-C deutlich reduziert. Die Behandlung von K562-Zellen mit Ara-C, jedoch nicht mit Hemin, führte zu einer deutlichen Reduzierung der Proteinexpression von c-Myb, PRMT4 und Mi-2. (Abb. 47 A). c-Myb und die transkriptionellen Coregulatoren PRMT4, Mi-2 α und Mi-2 β waren in ihren Transkriptmengen nach Behandlung der Zellen mit Hemin und Ara-C reduziert (Abb. 47 B).

In der Literatur ist beschrieben, dass Ara-C Merkmale der terminalen erythroiden Differenzierung in K562-Zellen hervorruft (Luisi-DeLuca et al. 1984). Die Hemin-induzierte Bildung von Hämoglobin ist hingegen reversibel und nicht mit der terminalen Differenzierung von K562-Zellen verbunden (Dean et al. 1981). Eine Reduktion der Expression von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 könnte daher mit dem Voranschreiten der erythroiden Differenzierung korrelieren.

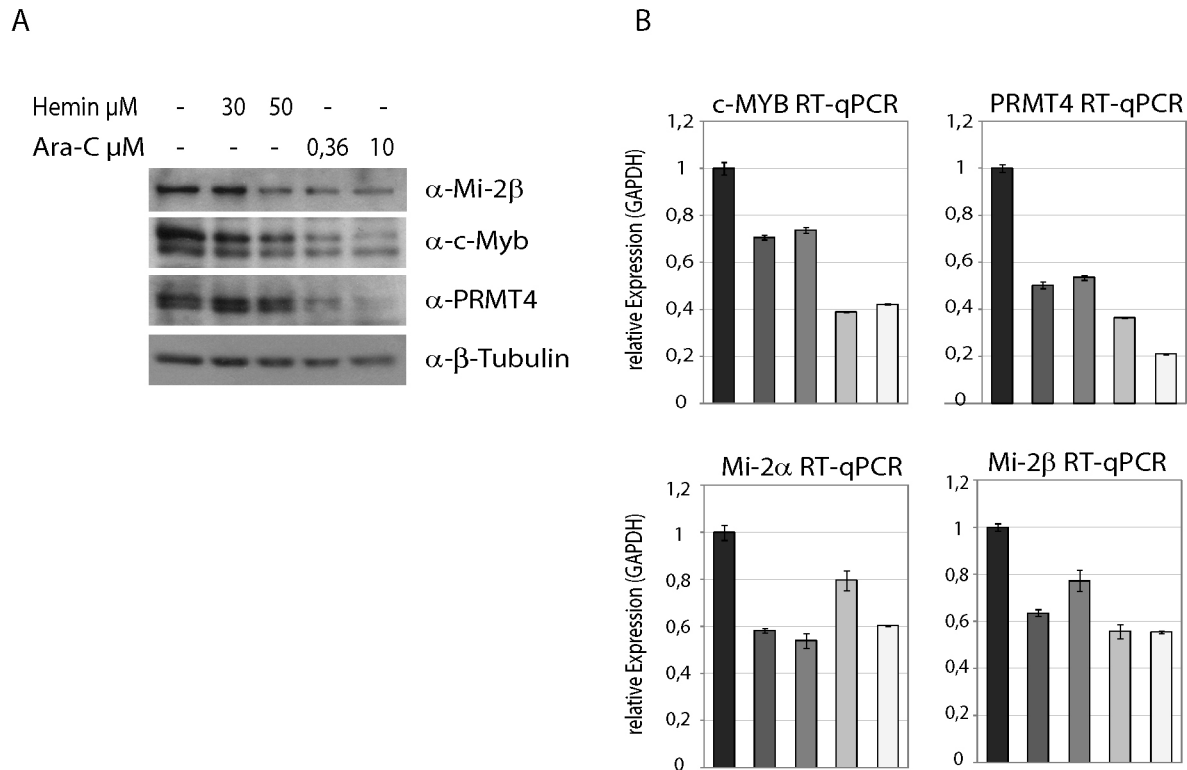


Abb. 47 Expression von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 während der erythroiden Differenzierung

K562-Zellen wurden wie in Abb. 46 differenziert und in **A.** für den Nachweis der Proteinexpression von c-Myb (α -c-Myb 1:1000), PRMT4 (α -PRMT4 1:500) und Mi-2 (α -Mi-2 1:500) im Vergleich zu β -Tubulin (α - β -Tubulin 1:5000) in der Western Blot-Färbung verwendet. In **B.** erfolgte der Nachweis der Transkriptmengen von c-MYB, PRMT4, Mi-2 α und Mi-2 β mittels RT-qPCR. Die Expression wurde gegen die GAPDH-Expression standardisiert und die Expression auf die undifferenzierte Probe bezogen.

5.9.2. c-Myb, PRMT4 und Mi-2 sind für den Erhalt des undifferenzierten Zellstatus wichtig

Um zu überprüfen, ob PRMT4 und Mi-2 eine ähnliche Auswirkung auf die Differenzierung haben wie c-Myb, wurden die Proteine c-Myb, PRMT4, Mi-2 α und Mi-2 β in K562-Zellen mit siRNA wie zuvor (Abb. 41) depletiert und mit Hemin differenziert. Zur Analyse des Ausmaßes der Differenzierung wurde eine Benzidinfärbung durchgeführt, da diese die gesamte Globinexpression in der Zelle repräsentiert (Abb. 48). Die Hemin-induzierte Differenzierung wurde einer Ara-C-induzierten vorgezogen, da Ara-C toxisch auf Zellen wirkt und der hohe Anteil an Zelldebris die Auswertung der Benzidinfärbung verfälscht. In unbehandelten Zellen führte allein schon der Verlust von c-Myb bzw. Mi-2 β zu einer Zunahme der Differenzierung um 40 % bzw. 30 %. Nach Behandlung mit Hemin, stieg der Anteil differenzierter Zellen in den Kontrollen ohne siRNA und sictrl von 15 % auf 40 % an. Im Vergleich dazu waren mit 65 % etwa 25 % mehr Zellen im *knockdown* von c-Myb und Mi-2 β differenziert. Die Depletion von PRMT4 hatte mit einem Anstieg auf 55 % benzidinpositive Zellen ebenfalls einen

deutlichen Effekt auf die Differenzierung von K562-Zellen. Der Verlust von Mi-2 α bewirkte eine leichte Zunahme differenzierter Zellen um 5 % im Vergleich zu sictrl. Es konnte also gezeigt werden, dass vor allem der Verlust von c-Myb und Mi-2 β , aber auch von PRMT4 und schwächer von Mi-2 α die Differenzierung von K562-Zellen begünstigt (Abb. 48).

A

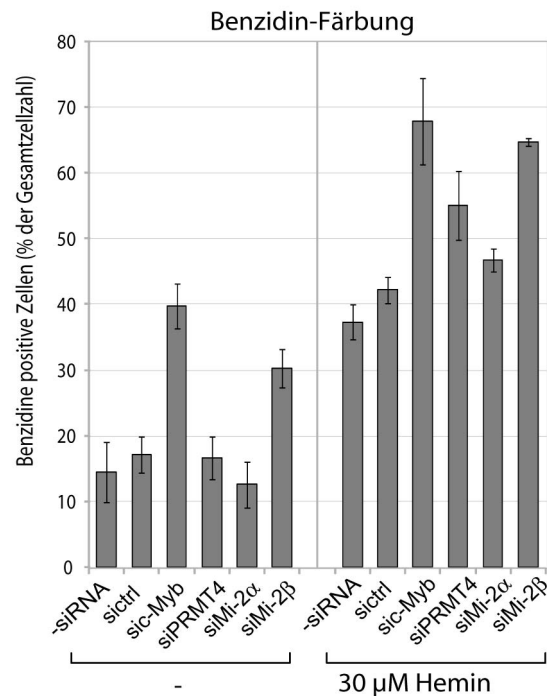


Abb. 48 Differenzierung von K562-Zellen im *knockdown* von c-Myb, PRMT4, Mi-2 α und Mi-2 β

K562-Zellen wurden durch Elektroporation mit 6 μ g eines siRNA-Pools gegen c-Myb (Dharmacon), PRMT4 (Pool aus siPRMT4_1, 2 und _3), siMi-2 α (Pool aus siMi-2 α _1 und _2), siMi-2 β (Pool aus siMi-2 β _1 und _2) und mit Kontroll-siRNA (Pool aus siNON, siLuciferase und siscrambled) oder ohne siRNA mittels Elektroporation transfiziert. 3 Tage nach Transfektion wurden Zellen mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen/ml zu je 1,5 ml in Triplikaten für 3 Tage nicht behandelt oder mit 30 μ M Hemin behandelt. Zur Analyse der Differenzierung wurde eine Benzidinfärbung durchgeführt.

Die Proteine PRMT4 und Mi-2 wurden in dieser Arbeit erstmals physisch und funktionell miteinander in Verbindung gebracht. In HD11-Zellen konnte gezeigt werden, dass PRMT4 und Mi-2 die c-Myb-vermittelte Genexpression der Gene *mim-1* und *Lysozym* synergistisch coaktivieren. In der hämatopoetischen Zelllinie K562 werden die c-Myb-Zielgene *CDC7* und *c-MYC* durch eine direkte Bindung von PRMT4 und Mi-2 β in ihrer Transkription positiv reguliert. Die Analysen der Proliferation und des Zellzyklus sowie der Differenzierung zeigten, dass PRMT4 und Mi-2 in ihren biologischen Effekten mit denen von c-Myb korrelieren. Diese Resultate legen nahe, dass PRMT4 und Mi-2 als direkte transkriptionelle Regulatoren des Transkriptionsfaktors c-Myb dessen biologische Funktionen regulieren.

6. Diskussion

Mit der Identifikation von PRMT4 als transkriptionellen Coaktivator nukleärer Hormonrezeptoren (NR) war PRMT4 die erste Argininmethyltransferase, die mit der Regulation der Transkription in Verbindung gebracht wurde (Chen et al. 1999). Inzwischen ist eine transkriptionsaktivierende Funktion von PRMT4 und auch PRMT1 für viele weitere Transkriptionsfaktoren belegt (Bedford and Clarke 2009). Für die Coaktivierung der Transkriptionsfaktoren NR, p53 und NF- κ B wurde eine synergistische Kooperation von PRMT1 und PRMT4 gezeigt (Koh et al. 2001; An et al. 2004; Hassa et al. 2008). Für die kooperative transkriptionelle Aktivierung des Estrogen-, Androgen- und Thyroidhormonrezeptors durch PRMT1 und PRMT4 ist die Interaktion mit Proteinen der p160-Familie essentiell (Chen et al. 1999; Koh et al. 2001). p160 interagiert sowohl mit dem nukleären Hormonrezeptor als auch mit verschiedenen Coaktivatoren und dient somit als Brückenprotein. Innerhalb solcher Coaktivator-Komplexe kann PRMT4 neben PRMT1 mit weiteren Coaktivatoren wie CBP, Flightless I, CoCoA, und β -Catenin assoziieren und mit diesen kooperativ wirken (Chen et al. 2000; Koh et al. 2002; Lee et al. 2004; Kim et al. 2006). Desweiteren wurde PRMT4 als Bestandteil des estrogeninduzierten NUMAC-Komplexes (*nucleosomal methylation activator complex*) zusammen mit acht Mitgliedern der SWI/SNF-Familie der Chromatinremodeller aufgereinigt. Dieser Komplex assembliert an einem estrogeninduzierten Gen, um dort die estrogenrezeptorabhängige Transkription zu verstärken (Xu et al. 2004). Neben der Rolle als direkter transkriptioneller Aktivator, übt PRMT4 eine Funktion in der posttranskriptionellen Regulation aus. Durch die Methylierung der RNA-bindenden Proteine HuR und HuD greift PRMT4 in den RNA-Metabolismus ein (Li et al. 2002; Fujiwara et al. 2006). Eine weitere Studie zeigte, dass PRMT4 durch die Methylierung von Splicingfaktoren die Transkription mit der mRNA-Prozessierung koppelt (Cheng et al. 2007). PRMT4 ist als Regulator der Transkription an wichtigen biologischen Prozessen beteiligt. So trägt PRMT4 zur Muskeldifferenzierung, zur endochondralen Ossifikation und zur Reifung von T-Lymphozyten und Adipozyten bei (Kim et al. 2004; Yadav et al. 2008; Ito et al. 2009). Es verdichten sich außerdem Hinweise, dass PRMT4 für den Erhalt der Pluripotenz während der embryonalen Entwicklung wichtig ist (Torres-Padilla et al. 2007; Wu et al. 2009).

Um weitere Funktionen und Signalwege aufzudecken, in denen PRMT4 eine Rolle spielt, wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen gewählt. 1. Mit einer globalen

Genexpressionsanalyse unter Verwendung eines Microarrays wurden neue potentielle Zielgene identifiziert, die kooperativ von PRMT1 oder PRMT4 reguliert werden 2. Die Aufreinigung endogener PRMT4-Komplexe und die Analyse der Proteine in der Massenspektrometrie sollten zur Identifikation neuer Interaktionspartner von PRMT4 führen.

6.1. PRMT1 und PRMT4 kooperieren in der IL-4-vermittelten Genexpression

6.1.1. PRMT1, PRMT4 und STAT5 regulieren die IL-4-induzierte Transkription von CITED2

In der Arbeit von Markus Kleinschmidt wurden mit einer globalen Genexpressionsanalyse neue putative Zielgene identifiziert, die in ihrer Transkription direkt oder indirekt von PRMT1 und PRMT4 kooperativ reguliert werden (Dissertation Markus Kleinschmidt, 2006). Da die transkriptionelle Kooperation von PRMT1 und PRMT4 in der Regel durch sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, wurden die 46 deregulierten Gene hinsichtlich potentieller Transkriptionsfaktor-Bindestellen untersucht. Es wurden Bindestellen für STAT5 und STAT6 in einigen der durch PRMT4 und PRMT1 aktivierten putativen Zielgenen identifiziert.

STAT6 wurde ursprünglich als IL-4-induziertes STAT aufgereinigt (Hou et al. 1994). IL-4 wird durch T-Lymphozyten, Basophile und Mastzellen sekretiert. Das Cytokin moduliert das Gleichgewicht zwischen T-Helfer-Zellen Th1 und Th2. Ist dieses Gleichgewicht gestört, führt dies zu immunologischen Krankheiten wie Allergien, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen. Die Aktivierung von STAT6 ist für die IL-4-vermittelten Funktionen entscheidend (Takeda et al. 1996). So ist STAT6 für die IL-4-induzierte Differenzierung von Th2-Zellen und für den Klassenwechsel der Immunglobuline sowie für die Proliferation in B-Zellen wichtig (Shimoda et al. 1996; Takeda et al. 1996; Paukku and Silvennoinen 2004). IL-4 bewirkt neben der Aktivierung von STAT6 auch die Aktivierung von STAT5A und STAT5B und induziert die transkriptionelle Expression der STAT5-Zielgene *Cis*, *Osm* und *Pim-1* in T-Zellen (Lischke et al. 1998). STAT5A und STAT5B sind in ihrer Aminosäuresequenz bis zu 95 % identisch und haben redundante sowie nicht-überlappende Funktionen. STAT5A wird vorwiegend im Brustgewebe exprimiert und ist für das Prolaktin vermittelte Wachstum der Brustdrüse sowie für die Laktation wichtig. STAT5B wird hauptsächlich in der Leber und im Muskel exprimiert und ist für den Signalweg des Wachstumshormons (*growth hormone*, GH) essentiell (Liu et al. 1997; Paukku and Silvennoinen 2004). Beide STAT5-Proteine sind für die

Entwicklung des hämatopoetischen Systems essentiell. STAT5-*knockout* Mäuse sind unempfindlich gegenüber Erythropoietin, IL-2 und IL-7. Daher haben sie Defekte in der Erythropoese, in der Entwicklung und Expansion von T-Zellen, bei der Bildung von Natural Killer-Zellen und der Differenzierung von B-Zellen (Imada et al. 1998; Moriggl et al. 1999; Socolovsky et al. 1999; Sexl et al. 2000; Wittig and Groner 2005).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-4 in HeLa-Zellen das Anschalten des STAT5- und STAT6-Signalweges bewirkt. Die von PRMT1 und PRMT4 kooperativ aktivierten Gene CITED2 und KRT8 wurden mit IL-4 transkriptionell induziert. Nach einer PRMT1/PRMT4-Codepletion bzw. einer STAT5-Depletion ging die transkriptionelle Induzierbarkeit des CITED2-Gens durch IL-4 verloren. Die transkriptionelle Aktivität von KRT8 blieb hingegen unbeeinflusst. Da die Depletion von STAT6 zu einem Verlust der transkriptionellen Induktion von CITED2 und KRT8 führte, aber auch die Transkription von PRMT1 und PRMT4 negativ beeinflusste, konnte ein indirekter Einfluss von STAT6 auf CITED2 und KRT8 postuliert werden. Anhand eines Reporteragen-Assays konnte eine direkte Coaktivierung der STAT6-vermittelten Genexpression durch PRMT1 und PRMT4 ausgeschlossen werden (Daten von Markus Kleinschmidt). Im Gegensatz dazu wurde die STAT5B-vermittelte Reporteraktivität durch PRMT1 und PRMT4 kooperativ verstärkt. Es lag daher die Vermutung nahe, dass PRMT1 und PRMT4 die IL-4-induzierte STAT5-abhängige Transkription des CITED2-Gens kooperativ aktivieren.

6.1.2. Die CITED2-Genexpression wird durch vielseitige Stimuli induziert

Das Genprodukt des CITED2-Gens ist ein nukleäres Protein, das mit p300 und CBP interagiert und transformierend auf Zellen wirkt (Zhang et al. 1998a). CITED2 coaktiviert den Transkriptionsfaktor TFAP-2 (Transkriptionsfaktor AP-2), indem es TFAP-2 mit p300/CBP zusammenbringt (Braganca et al. 2002). Andererseits inhibiert CITED2 den Transkriptionsfaktor HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α), indem es die Interaktion zwischen CBP und HIF-1 α stört (Braganca et al. 2002; Shin et al. 2008). Die Expression von CITED2 wird in unterschiedlichen Zelltypen durch viele verschiedene Cytokine und Wachstumsfaktoren induziert (Zhang et al. 1998a). In der vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, dass CITED2 durch einen Serumstimulus (FCS) im Vergleich zu gehungerten Zellen transkriptionell induziert wird. Durch einen PRMT1/PRMT4-Doppelknockdown wurde die Transkription des CITED2-Gens unter normalen Wachstumsbedingungen negativ beeinflusst. Die FCS-stimulierte

Expression von CITED2 war zwar PRMT1/PRMT4-abhängig, jedoch STAT5-unabhängig und wird folglich durch andere Transkriptionsfaktoren vermittelt. Es war zu beobachten, dass ein kombinierter FCS/IL-4-Stimulus das CITED2-Gen stärker transkriptionell induziert als die Summe der einzelnen Stimuli mit FCS bzw. IL-4. Aus der Literatur ist bekannt, dass STAT5 in der Regulation der Transkription mit anderen Faktoren wechselwirkt. Beispielsweise wurde mit Reporter-gen-Assays gezeigt, dass die GH-induzierte Serinphosphorylierung von STAT5B die Luciferaseaktivität einiger STAT5B-aktiverter Promotoren steigert (Park et al. 2001). Ein weiteres Beispiel ist das Zinkfingerprotein YY1. Dieses wurde in einem GH-induzierten Komplex zusammen mit STAT5A und STAT5B und dem GH-Rezeptor gefunden. Die Autoren nahmen an, dass auf Grund der Promotorstruktur des Spi 2.1-Gens die Interaktion zwischen den STAT5-Dimeren an benachbarten GAS-Elementen (γ -activated sites) durch YY1 stabilisiert würde (Bergad et al. 2000). Außerdem wurde für nukleäre Hormonrezeptoren eine positive Wechselwirkung mit STAT5 in der Transkription beschrieben (Bjornstrom et al. 2001; Hennighausen and Robinson 2008). Es ist daher denkbar, dass eine Kombination des IL-4-Stimulus mit einem Serumstimulus die transkriptionelle Aktivität von STAT5 über andere Faktoren potenziert.

6.1.3. CITED2 ist ein direktes Zielgen von PRMT1, PRMT4 und STAT5

PRMT1 und PRMT4 üben innerhalb von Coaktivatorkomplexen ihre Funktion aus und werden dabei von Transkriptionsfaktoren an bestimmte Zielgene rekrutiert. Anhand von Interaktionsstudien wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass STAT5 nach einem IL-4-Stimulus mit PRMT1 und PRMT4 interagieren kann. Mit ChIP-Analysen wurde eine IL-4-abhängige Rekrutierung von PRMT1, PRMT4 und STAT5 an den CITED2-Promotor belegt. Der Befund, dass CITED2 ein Zielgen von STAT5 ist, stimmt mit der Literatur überein. Kürzlich wurde gezeigt, dass Erythropoietin einen Foxo3a/STAT5-Komplex induziert, der an die STAT5-Bindestelle im CITED2-Promotor bindet und dessen Transkription aktiviert (Bakker et al. 2007). Interessanterweise nutzt STAT5 ähnliche Coaktivatoren wie andere durch PRMT1 und PRMT4 coaktivierte Transkriptionsfaktoren. So interagieren p300/CBP und die p160-Coaktivatorfamilie direkt mit STAT5 und coaktivieren synergistisch die STAT5A-vermittelte Genexpression des β -Casein-Gens (Pfützner et al. 1998; Litterst et al. 2003). Auf Grund dieser Erkenntnisse sowie den Ergebnissen der ChIP-Analysen und der Interaktionsstudien kann vermutet werden, dass STAT5, PRMT1 und PRMT4 durch eine direkte Promotorbindung innerhalb eines Coaktivatorkomplexes die IL-4-induzierte Transkription der CITED2-Gens

aktivieren. Es wurde nicht eindeutig belegt, dass PRMT1 und PRMT4 tatsächlich durch STAT5 an die Zielgene rekrutiert werden. Die Daten aus dieser Arbeit zusammen mit dem von Markus Kleinschmidt durchgeführten Reporter-gen-Assay weisen auf eine Rolle von PRMT1 und PRMT4 als direkte Coaktivatoren in der STAT5-vermittelten Genexpression hin.

Die Bindung von STAT5 und PRMT4 an den CITED2-Promotor verlief transient, mit einer maximalen Rekrutierung nach 8 Stunden Stimulation. PRMT1 blieb hingegen am CITED2-Promotor rekrutiert. STAT-Signalwege können an mehreren Punkten ihrer Signalkaskade negativ reguliert werden. STAT5 wird beispielsweise durch PIAS3 an der DNA, durch Phosphatasen im Cytosol oder Nukleus sowie durch SOCS (*Suppressors of cytokine signalling*)-Proteine auf der Ebene der Rezeptoren oder JAKs gehemmt (Pauku and Silvennoinen 2004). Ein negativer autoregulatorischer Mechanismus könnte daher die Dissoziation von STAT5 vom CITED2-Promotor und den Zerfall des Aktivator-komplexes bewirken.

6.1.4. Die Argininmethylierung kann durch Demethylasen revertiert werden

Die transkriptionelle Coaktivierung durch PRMT1 und PRMT4 geht mit der Dimethylierung von Histon H4 am R3 bzw. von Histon H4 am R17 einher. Diese Histonmodifikationen sind ausschließlich Markierungen aktiv transkribierter Gene (Ma et al. 2001; Strahl et al. 2001; Wang et al. 2001b; Bauer et al. 2002). Die Dimethylierung von Histon H4R3 begünstigt die Acetylierung der Histontermini durch p300/CBP und trägt damit zur Verstärkung der Transkription bei (Wang et al. 2001b; An et al. 2004). Obwohl mit zellfreien Chromatintranskriptions-Assays gezeigt wurde, dass die Methylierung von Histon H3 durch PRMT4 essentiell für die transkriptionelle Aktivierung ist, sind die molekularen Konsequenzen der H3R17-Dimethylierung bisher unbekannt (An et al. 2004). Auch am CITED2-Promotor waren H4R3 und H3R17 nach Stimulation mit IL-4 dimethyliert. Wie zuvor für die Rekrutierung von STAT5 und PRMT4 an die DNA beobachtet wurde, waren die Histonmodifikationen in einem transienten Verlauf nachweisbar. Ähnliches wurde in der Literatur am pS2-Gen, einem Modellgen für die ER-abhängige Genexpression, beschrieben. Nach Synchronisation der Transkription mit α -Amanitin und einem anschließenden Estrogenstimulus wurde am pS2-Gen eine zyklische Transkriptionsinitiation beobachtet, die mit einem zyklischen Vorhandensein der Argininmethylierung sowie der Enzyme PRMT1 und PRMT4 einherging (Metivier et al. 2003). Die Entdeckung der Arginindemethylase JMJD6

(*Jumonjido*main-containing 6) führte zu der Erkenntnis, dass die Arginmethylierung ähnlich wie die Lysinmethylierung dynamisch reguliert werden kann. JMJD6 gehört zur Familie der Dioxygenasen der JmjC-Familie und benutzt Fe^{2+} und α -Ketoglutarat als Cofaktoren. JMJD6 demethyliert *in vitro* und *in vivo* H4R3me2 und H3R2me2 (Chang et al. 2007). Ein weiteres Enzym, das an der Regulation der Argininmethylierung beteiligt ist, ist PADI4 (Peptidylarginin-Deiminase 4). Dieses Enzym entfernt in einer Deiminierungsreaktion die Aminogruppen von den Guanidinogruppen der Arginine, jedoch nicht von methylierten Argininen, und erzeugt dabei Citrullin. Es wird daher davon ausgegangen, dass PADI4 die Methylierung von Argininen verhindert (Wang et al. 2004; Hidaka et al. 2005; Rajmakers et al. 2007). Das in der ChIP-Analyse beobachtete dynamische Auftauchen von H4R3me2 und H3R17me2 am CITED2-Promotor, könnte auf die Wirkung von Arginindemethylasen zurückzuführen sein.

6.1.5. STAT5 und PRMT4 in der Tumorentstehung

Es wird vermutet, dass PRMT4 als Coaktivator des Androgenrezeptors mit der Entstehung von Prostatakarzinomen im Zusammenhang steht. Eine erhöhte Expression von PRMT4 korreliert mit dem Voranschreiten des Prostatakarzinoms und ist in androgenunabhängigen Prostatakarzinomen am höchsten (Hong et al. 2004; Majumder et al. 2006).

Eine konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktor STAT5A/B korreliert mit einem hohen histologischen Grad des Prostata-Karzinoms (Li et al. 2004). Der Verlust von STAT5A/B in hormonunabhängigen Prostatakarzinom-Zelllinien führt zum Zelltod (Ahonen et al. 2003). Es wurde eine funktionelle Synergie und physikalische Interaktion zwischen dem Androgenrezeptor und STAT5 gefunden, die zum Zellüberleben von Prostatakarzinomzellen beiträgt (Tan et al. 2008). Man kann spekulieren, dass die Coaktivierung von STAT5 durch PRMT4 einen weiteren Mechanismus zur Entstehung von Prostatakarzinomen darstellt. Voraussetzung dafür wäre, dass Prostatakarzinome mit einer erhöhten Expression von PRMT4 präferentiell STAT5-positiv sind.

6.2. Aufreinigung eines endogenen PRMT4 Komplexes

6.2.1. PRMT4 bildet höhermolekulare Komplexe

In Gelfiltrationsanalysen lag PRMT4 in verschiedenen Zellen vorwiegend mit einer Größe von 130 bis 400 kDa vor. Aus der Literatur war bekannt, dass PRMT4 Homodimere bildet. Beispielsweise gelang es zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Röntgenstruktur von PRMT4 zu lösen. Sie zeigten, dass PRMT4 als Dimer kristallisiert (Troffer-Charlier et al. 2007b; Yue et al. 2007). Da PRMT4-Homodimere eine Größe von etwa 140 kDa haben, lag die Vermutung nahe, dass endogenes PRMT4 Bestandteil eines Komplexes ist. Die Bildung ringförmiger Dimere ist unter den PRMTs konserviert und für die Methyltransferaseaktivität essentiell. (Weiss et al. 2000; Zhang et al. 2000; Teyssier et al. 2002; Troffer-Charlier et al. 2007a). Es wird vermutet, dass die Dimerstruktur für die Ausbildung der SAM-Bindestelle und für die Katalyse der Dimethylierung nötig ist (Zhang und Cheng 2003; Lee et al. 2007).

Es gibt außerdem Indizien dafür, dass PRMTs Homooligomere bilden können. Für Hefe RMT/hmt1 wurde mittels chemischen *crosslinkings* rekombinanter Proteine die Bildung von Hexameren gezeigt (Weiss et al. 2000). In RAT1-Zellen wurde anhand von Gelfiltrationen gezeigt, dass endogenes PRMT1 in einem höhermolekularen Komplex vorliegt. Dabei muss es sich jedoch nicht zwangsläufig um Homooligomere handeln. (Tang et al. 1998). In einer anderen Publikation wurden die Proteine PRMT1 und PRMT5 als getagte Proteine aus HEK293-Zellen aufgereinigt und deren Größe mit Dichtegradienten-Zentrifugation bestimmt. Die Autoren schlussfolgerten, dass PRMT1 und PRMT5 als Dimere und Tetramere vorliegen. Die PRMT5-haltigen Fraktionen aus der Dichtegradienten-Zentrifugation wiesen Methyltransferaseaktivität auf das PRMT5-Sustrat MBP (*myelin basic protein*) auf (Rho et al. 2001). Inzwischen hat man herausgefunden, dass PRMT5 nur dann katalytisch aktiv ist, wenn es zusammen mit MEP50 vorliegt (Krause et al. 2007). Da PRMT5 mit MEP50 eine stabile Interaktion ausbildet, haben die Autoren vermutlich nicht oligomeres PRMT5, sondern PRMT5 im Komplex mit MEP50 und vielleicht auch anderen Proteinen aufgereinigt (Friesen et al. 2002). Rekombinantes PRMT4 liegt in Lösung vorwiegend als Dimer vor, bildet aber auch Oktamere aus (Troffer-Charlier et al. 2007b). Es ist schwierig zu untersuchen und bleibt daher offen, ob PRMTs zur Ausübung ihrer Funktionen *in vivo* und im Kontext zellulärer Proteine tatsächlich Homooligomere ausbilden.

6.2.2. Es gibt keinen prädominanten PRMT4-Komplex

In dieser Arbeit wurde PRMT4 chromatographisch angereichert und mit einem PRMT4-Antikörper präzipitiert. Mit dieser Strategie gelang die massenspektrometrische Identifikation zweier neuer Interaktionspartner, Alix und Mi-2 α , deren Interaktion mit PRMT4 mittels CoIPs verifiziert wurde. Die Silberfärbung machte deutlich, dass keine Interaktionspartner in stöchiometrischen Mengen angereichert wurden. Im Vergleich zu anderen histonmodifizierenden Komplexen, wie beispielsweise NuRD, N-CoR-1 oder SWI/SNF, konnte daher kein prädominanter PRMT4-Komplex nachgewiesen werden (Cairns et al. 1994; Grant et al. 1997; Zhang et al. 1999; Underhill et al. 2000). Die Gelfiltrationsanalyse nach der MonoQ-Säule zeigte, dass die Größe potentieller PRMT4-Komplexe durch die Aufreinigung nicht destabilisiert wurde. Mögliche Ursachen für das Fehlen eines vorherrschenden PRMT4-Komplexes können sein:

1. PRMT4 geht viele verschiedene Wechselwirkungen ein: Anhand der Silberfärbung der Präzipitate waren neben den Proteinbanden von Mi-2 α und Alix weitere differenziell auftretende Banden in substöchiometrischen Mengen in der PRMT4-IP zu erkennen. Diese konnten auf Grund der geringen Proteinmengen in der Massenspektrometrie nicht identifiziert werden.
2. Ein PRMT4-Komplex bildet sich erst nach einem Stimulus aus: Die Aufreinigung des PRMT4 und SWI/SNF enthaltenden Komplexes NUMAC fand über den Flag-Tag eines stabil exprimierten PRMT4-Konstruktes nach Stimulation von MCF7-Zellen mit Estrogen statt (Xu et al. 2004). Im Gegensatz zu anderen Aufreinigungen von SWI/SNF-Komplexen ist der NUMAC-Komplex der bisher einzige SWI/SNF-Komplex, in dem PRMT4 vorkommt (Xu et al. 2004; Ryme et al. 2009). PRMT4 ist folglich keine grundsätzliche Untereinheit von SWI/SNF-Remodellern, sondern assoziiert erst nach einem Estrogenstimulus mit dem BRG1-Komplex. Für den NUMAC-Komplex wurde eine Größe von 670 kDa gezeigt (Xu et al. 2004). Der Vergleich des endogenen PRMT4 Proteins aus Gesamtzellextrakt von unbehandelten und Estrogen-behandelten MCF7-Zellen in der Gelfiltration zeigte jedoch keine Verschiebung des Elutionsprofils von PRMT4 hin zu einer Größe von 670 kDa (eigene Daten, nicht gezeigt). Endogenes PRMT4 liegt daher auch nach Estrogenbehandlung von MCF-7-Zellen nicht hauptsächlich im NUMAC-Komplex vor.
3. Für die Ausbildung eines stabilen PRMT4-Komplexes ist der Chromatinkontext wichtig: Obwohl die direkte Interaktion zwischen PRMT4 und der p160-Cotaktoren für die

transkriptionelle Aktivierung nukleärer Rezeptoren durch PRMT4 essentiell ist (Chen et al. 2000; Koh et al. 2001), waren weder in der hier durchgeführten Aufreinigung von PRMT4 noch in der des NUMAC-Komplexes Proteine der p160-Familie enthalten. Für PRMT4 ist bekannt, dass die Acetylierung von Histon H3K18 und H3K23 die Assoziation von PRMT4 mit dem Promotor des estrogeninduzierten pS2-Gens stabilisiert. Dies ermöglicht eine effiziente Dimethylierung von H3R17 und Coaktivierung des Estrogenrezeptors durch PRMT4 (Daujat et al. 2002). Für die Rekrutierung des SWI/SNF- und Mediatorkomplexes an die Zielgene nukleärer Hormonrezeptoren wurde Ähnliches gezeigt. Die Acetylierung von Histonen durch p300/CBP verstärkt die Bindung von SWI/SNF- und Mediator an den Promotor. Folglich werden die Coaktivatoren sowohl durch direkte Interaktionen mit anderen Coaktivatoren und den NR als auch durch Interaktionen mit den Histontermini an das Chromatin gebunden (Huang et al. 2003).

6.2.3. PRMT4 interagiert mit dem Chromatinremodeller Mi-2, aber nicht mit dem NuRD-Komplex

Die CoIPs unter Verwendung der Überexpressionskonstrukte für Mi-2 α und Mi-2 β zeigten, dass beide Mitglieder der Subfamilie II der CHD-Familie mit PRMT4 interagieren. In GST-IVT-Pulldowns wurden der N-Terminus und die Tandem-Chromodomäne als Interaktionsdomänen von Mi-2 α mit PRMT4 identifiziert. Mi-2 α (Isoform 1) und Mi-2 β haben eine Sequenzidentität von insgesamt etwa 65 %, wobei der *Double*-PHD-Finger, die Tandem-Chromodomänen und die Helikasedomäne am stärksten und der N- und C-Terminus mit über 40 % Sequenzidentität etwa weniger stark konserviert sind. In einigen Sequenzabschnitten des C-Terminus unterscheiden sich Mi-2 α und Mi-2 β sehr. So kommt der äußerste C-Terminus von Mi-2 α nicht in Mi-2 β vor und ein Sequenzabschnitt von ca. 200 AS innerhalb des C-Terminus weist eine geringe Sequenzidentität von 20 % auf. Auf Grund der hohen Sequenzidentität zwischen Mi-2 α und Mi-2 β kann vermutet werden, dass auch Mi-2 β vermutlich über den N-Terminus und die Tandem-Chromodomänen mit PRMT4 interagiert.

Entsprechend der Ähnlichkeit von Mi-2 α und Mi-2 β sind ihre Wirkmechanismen ähnlich. Als zentrale Komponenten des NuRD-Komplexes sind sie als Repressoren der Transkription beschrieben. Da Mi-2 in dieser Arbeit als Interaktionspartner von PRMT4 gefunden wurde, wurde untersucht, ob PRMT4 mit dem NuRD-Komplex assoziiert. Anhand von CoIPs konnte keine Interaktion von PRMT4 mit den NuRD-Komponenten HDAC1 und MBD3 nachgewiesen

werden. Da PRMT4 nicht mit HDAC1 interagiert, konnte außerdem ausgeschlossen werden, dass PRMT4 nicht mit anderen HDAC1-haltigen Repressorkomplexen interagiert. In Übereinstimmung damit konnte in der Diplomarbeit von Marc Zeller (AG Bauer, 2008) mit Gelfiltrationsanalysen festgestellt werden, dass die NuRD-Komponenten MBD3, RbAp46/48 und Mi-2 α in einem höhermolekularen Bereich von etwa 2 MDa eluieren. Ein gewisser Anteil Mi-2 α war außerdem in PRMT4-haltigen Fraktionen nachweisbar.

6.3. PRMT4 und Mi-2 kooperieren in der transkriptionellen Regulation

6.3.1. Mi-2 α und Mi-2 β als Aktivatoren der Transkription

Mi-2 α und Mi-2 β sind in der Literatur überwiegend als individuelle Regulatoren der Transkription beschrieben. Die repressive Funktion beider Proteine wird durch die spezifische Rekrutierung des NuRD-Komplexes an die Zielgene vermittelt. Dabei ist der C-Terminus von Mi-2 bisher als Interaktionsdomäne für transkriptionelle Repressoren beschrieben (Schultz et al. 2001; Pastorcic and Das 2007). Zum Beispiel ist das RET-Finger Protein (RFP) ein transkriptioneller Repressor, der mit dem C-Terminus von Mi-2 β interagiert. Außerdem wurde eine Interaktion von RFP und HDAC1 *in vivo* sowie deren Kolokalisation in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Wie erwartet bewirkte Mi-2 β eine RFP-vermittelte transkriptionelle Repression in Gal4-Bindungs-Assays (Shimono et al. 2003). Es gibt Befunde, die auf eine transkriptionell aktivierende Rolle von Mi-2 hinweisen. Die Kartierung der transkriptionellen Aktivität einzelner Domänen von Mi-2 β deckte auf, dass der C-Terminus und die Tandem-Chromodomäne unabhängig voneinander repressiv wirkten, der N-Terminus von Mi-2 β hingegen transkriptionell aktivierend. Die Autoren führten die aktivierende Funktion des N-Terminus von Mi-2 β auf die Interaktion mit BRG-1, einem Remodellerprotein der SWI/SNF-Komplexes, zurück (Shimono et al. 2003). Später zeigte die gleiche Gruppe, dass Mi-2 β mit RFP im Nucleolus die Transkription von rRNA-Genen aktiviert (Shimono et al. 2005). In T-Lymphozyten wurde gefunden, dass Mi-2 β eine transkriptionsaktivierende Rolle bei der Expression des CD4-Gens spielt. Mi-2 β assoziiert mit dem E-Box bindenden Protein HEB und der Histonacetyltransferase p300 und ermöglicht deren Rekrutierung an den Enhancer des CD4-Gens (Williams et al. 2004). Kürzlich wurde Mi-2 α als Coaktivator des Transkriptionsfaktors c-Myb identifiziert. Dabei interagiert der N- und schwächer der C-Terminus von Mi-2 α mit c-Myb. Die Autoren bestätigten eine transkriptionell aktivierende Funktion des N-Terminus von Mi-2 α , wie es für Mi-2 β im

Zusammenhang mit BRG1 beobachtet wurde (Shimono et al. 2005; Saether et al. 2007). Sie fanden weiterhin heraus, dass die Helikaseaktivität nicht notwendig für die Coaktivierung von c-Myb ist (Saether et al. 2007).

Die in dieser Arbeit gefundene Interaktion zwischen Mi-2 und PRMT4 wird über den N-Terminus, der mit einer Aktivatorfunktion von Mi-2 α in Verbindung gebracht wurde, aber auch über die Chromodomäne vermittelt. Außerdem ist PRMT4 nicht mit dem NuRD-Repressorkomplex assoziiert. Da PRMT4 einen transkriptionellen Coaktivator vieler Transkriptionsfaktoren darstellt und es in der Literatur Hinweise auf eine Aktivatorfunktion von Mi-2 gab, lag die Vermutung nahe, dass Mi-2 zusammen mit PRMT4 in der transkriptionellen Aktivierung der Genexpression wirkt.

6.3.2. PRMT4 und Mi-2 aktivieren kooperativ die c-Myb-vermittelte Genexpression

Die Hühnchen-Makrophagenzelllinie HD11 ist ein Modellsystem für die Untersuchung der c-Myb-abhängigen Genexpression. Da diese c-Myb endogen nicht exprimieren, kann durch Wiedereinbringen von c-Myb die Expression der myeloiden Gene *mim-1* und *Lysozym* wiederhergestellt werden (Ness et al. 1989; Burk et al. 1993; Ness et al. 1993). Mittels Cotransfektions-Assays in HD11-Zellen wurde PRMT4 als neuer Coaktivator des hämatopoetischen Transkriptionsfaktors c-Myb identifiziert. Die Interaktion von PRMT4 mit c-Myb bewirkt dabei vermutlich die Rekrutierung von PRMT4 an die c-Myb-Zielgene (Abb. 49). Ähnliches könnte für Mi-2 α zutreffen. Eine Interaktion zwischen Mi-2 α und c-Myb wurde ursprünglich in einem *Two-Hybrid*-Assay gefunden (Saether et al. 2007). Anhand von CoIPs konnte in der vorgelegten Arbeit eine Interaktion mit c-Myb für Mi-2 α und Mi-2 β festgestellt werden (Abb. 49). Dementsprechend konnte die in der Literatur beschriebene Coaktivatorfunktion von Mi-2 α bestätigt und auch für Mi-2 β nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass Mi-2 α und Mi-2 β den gleichen Transkriptionsfaktor coaktivieren.

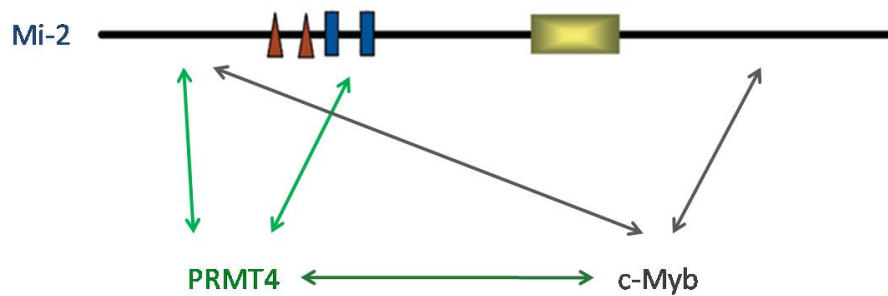


Abb. 49 Zusammenfassung der Interaktionen zwischen PRMT4, Mi-2 und c-Myb

Mi-2 wurde als Interaktionspartner von PRMT4 in dieser Arbeit identifiziert und verifiziert. Der N-Terminus und die Chromodomäne von Mi-2 (Mi-2 α) interagieren mit PRMT4. Aus der Literatur war bekannt, dass der N- und schwächer der C-Terminus von Mi-2 α mit c-Myb interagieren (Saether et al. 2007). Es wurde gezeigt, dass auch Mi-2 β mit c-Myb interagiert. Außerdem konnte eine direkte Interaktion zwischen PRMT4 und c-Myb nachgewiesen werden. (Domänen von Mi-2, rot = PHD-Finger, blau = Chromodomäne, gelb = ATPase-Domäne)

Der Nachweis der Interaktion von c-Myb und Mi-2 β erfolgte mit einem Konstrukt, das Mi-2 β mit einer C-terminalen Deletion von ca. 300 AS codiert. Dieses Protein interagiert zwar mit PRMT4, koaktiviert jedoch nicht die c-Myb-vermittelte Genexpression. Der C-Terminus von Mi-2 β ist daher für die transkriptionelle Koaktivierung von c-Myb wichtig. In Übereinstimmung damit wurde in der Literatur beschrieben, dass der C-Terminus von Mi-2 α mit der FAETL-Domäne von c-Myb interagiert (Saether et al. 2007). Bei dieser Domäne handelt es sich um ein kurzes Sequenzmotif in der negativ regulatorischen Domäne von c-Myb, die für die Transaktivierung wichtig ist (Fu and Lipsick 1996; Lipsick and Wang 1999). Der C-Terminus von Mi-2 ist daher für die Aktivierung der Transkription wichtig, vermutlich indem dieser mit anderen Faktoren interagiert oder die Aktivität von c-Myb direkt reguliert.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PRMT4 sowohl mit Mi-2 α als auch mit Mi-2 β in der transkriptionellen Aktivierung des *mim-1* und Lysozymgens durch c-Myb synergistisch kooperiert. Vermutlich ist dafür die Interaktion von PRMT4 mit dem N-Terminus und der Chromodomäne von Mi-2 relevant. Auch das virale Onkogen v-Myb des Vogelleukämievirus E26 wird in seiner transkriptionellen Aktivität auf das *mim-1*-Gen durch PRMT4 und Mi-2 kooperativ verstärkt. Die kooperative Koaktivatorfunktion von PRMT4 und Mi-2 konnte anhand eines weiteren c-Myb-regulierten Gens in einer nicht-hämatopoetischen Zelllinie bestätigt werden. So wurde in HEK293-Zellen der Promotor des TRHR (*Thyrotropin-Releasing-Hormone-Rezeptor*)-Gens in einem Reporter-gen-Assay durch PRMT4 und Mi-2 α kooperativ aktiviert.

Die Expression des *mim-1*-Gens unterliegt der Kontrolle eines Promotors und eines ca. 2 kbp stromaufwärts vom Transkriptionsstart gelegenen Enhancers. Beide Regionen enthalten jeweils mehrere Myb-Bindestellen (Ness et al. 1989; Chayka et al. 2005). In Reporter-Gen-Assays mit dem Promotor- und Enhancerfragment sowie einer Fusion aus Promotor und Enhancer wurde eine Kooperation beider regulatorischer Regionen in der v-Myb-vermittelten Genexpression des *mim-1*-Gens in HD11-Zellen gezeigt (Chayka et al. 2005). In den in der vorgelegten Arbeit durchgeführten Experimenten führte die Cotransfektion der Reporterkonstrukte mit c-Myb zu einem Anstieg der Luciferase-Aktivität wie es zuvor für v-Myb beschrieben wurde. Die Luciferaseaktivität des Promotor- und Enhancerkonstruktes sowie der Fusion wurden durch Cotransfektion von PRMT4 und Mi-2 α allein oder in Kombination gesteigert. Die kooperative Wirkung von PRMT4 und Mi-2 war mit dem Promotorfragment und der Enhancer-Promotorfusion am deutlichsten. Dies spricht dafür, dass eher der Promotor die transkriptionelle Kooperation zwischen PRMT4 und Mi-2 vermittelt als der Enhancer, aber beide Fragmente für eine effiziente Aktivierung des *mim-1*-Gens nötig sind.

6.3.3. Die katalytische Aktivität von PRMT4 und Mi-2 ist für die Coaktivatorfunktion essentiell

Die katalytische Aktivität von PRMT4 ist für Coaktivatorfunktion sowie für die biologischen Funktionen von PRMT4 essentiell. Eine katalytisch inaktive Mutante, die den Methylgruppendonor SAM nicht mehr binden kann, coaktiviert nicht mehr die hormonrezeptorvermittelte Transkription (Chen et al. 1999). Auf Grund seiner Fähigkeit Interaktionen mit anderen Cofaktoren und Transkriptionsfaktoren einzugehen, wurde für PRMT4 eine zusätzliche Funktion als Gerüstprotein postuliert (*scaffolding function*). In Reporter-Gen-Assays einiger NF- κ B-abhängiger Zielgene und in der Kooperation mit β -Catenin, wies eine katalytische Mutante von PRMT4 noch eine partielle Coaktivatorfunktion auf (Koh et al. 2002; Hassa et al. 2008). Eine Studie über Mäuse mit einem *knock-in* einer katalytisch inaktiven Mutante von PRMT4 zeigte andererseits, dass die katalytische Aktivität essentiell für die biologischen Funktionen von PRMT4 ist. Die Phänotyp der *knock-in* Maus glich dem der *knock-out* Maus für PRMT4 (Kim et al. 2009). In der vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, dass die Transfektion der katalytischen Mutante von PRMT4 im Vergleich zum wildtypischen Protein zu einem vollständigen Verlust der Coaktivierung der c-Myb-abhängigen Genexpression durch PRMT4 führte.

Die Transfektion einer katalytischen Mutante von Mi-2 α , die keine Helikaseaktivität mehr aufweist, verminderte die Coaktivatorfunktion von Mi-2 α in der c-Myb-vermittelten Genexpression ebenfalls. Dies steht im Gegensatz zu den Daten von Saether et al. 2007. Diese zeigten, dass Mi-2 α die c-Myb-vermittelte Genexpression unabhängig von der Helikasedomäne aktiviert (Shimono et al. 2003; Saether et al. 2007). Die Autoren postulierten daher eine duale Funktion von Mi2 α , eine repressive, von der Helikaseaktivität abhängige und eine aktivierende, von der Helikaseaktivität unabhängige Funktion. Anhand der hier vorgelegten Daten konnte dieser Befund nicht bestätigt werden, da die Coaktivatorfunktion von Mi-2 α nahezu vollständig von der katalytischen Aktivität von Mi-2 α abhing.

Die synergistische Kooperation von PRMT4 und Mi-2 α ist vom Vorhandensein der katalytischen Aktivität beider Proteine abhängig. Schon der Verlust der katalytischen Aktivität eines Partners führt zum Verlust des synergistischen Effektes. Es ist daher anzunehmen, dass PRMT4 und Mi-2 sich in ihrer katalytischen Aktivität positiv beeinflussen und dies entscheidend für die kooperative Funktion als transkriptionelle Aktivatoren ist.

6.3.4. PRMT4 und Mi-2 sind direkte Regulatoren von c-Myb-Zielgenen

Die humane erythroleukämische Zelllinie K562 wird häufig zur Untersuchung der biologischen Funktion und der Zielgene von c-Myb herangezogen (Shetzline et al. 2004; Berge et al. 2007; Nakata et al. 2007). In dieser Arbeit wurden K562-Zellen verwendet, um den transkriptionellen Einfluss von PRMT4 und Mi-2 auf bekannte c-Myb-Zielgene zu untersuchen. Es stellte sich heraus, dass die c-Myb-Zielgene CDC7, c-MYC und GATA3 durch PRMT4 und Mi-2 transkriptionell aktiviert werden. Gegenüber Mi-2 β ist Mi-2 α ein schwächerer Regulator dieser Zielgene. In der transkriptionellen Regulation von c-Myb-Zielgenen gibt es folglich Unterschiede zwischen Mi-2 α und Mi2- β . ChIP-Analysen zeigten, dass c-Myb, PRMT4 und Mi-2 β direkt an die Promotoren von CDC7 und c-MYC binden und die Zielgene daher direkt am Promotor regulieren. Die Regulation c-Myb-abhängiger Gene durch Mi-2 war nicht grundsätzlich transkriptionell aktivierend. CCNB1 ist beispielsweise zwar ein durch PRMT4 aktiviertes Gen, unterliegt jedoch einer negativen Regulation durch Mi-2. In der ChIP-Analyse konnten PRMT4 und c-Myb am Promotor des Gens nachgewiesen werden, jedoch nicht Mi-2 β . Daher reguliert Mi-2 β die Expression von CCNB1 entweder indirekt oder bindet in einer anderen Region des Gens.

Diese Resultate zusammen mit den Ergebnissen aus den Cotransfektions-Assays in den HD11-Zellen und den durchgeführten Interaktionsstudien belegen, dass PRMT4 und Mi-2 bekannte c-Myb-Zielgene transkriptionell aktivieren, indem sie vermutlich durch c-Myb an den Promotor gebunden werden.

6.3.5. Mechanismen der Kooperation zwischen PRMT4 und Mi-2

Eine wechselseitige Regulation zwischen PRMT4 und dem Remodellerprotein BRG1 wurde innerhalb des NUMAC-Komplexes beschrieben. Die Studie zeigte, dass PRMT4 und das SWI/SNF-Protein Brg1 direkt interagieren und in der transkriptionellen Aktivierung eines estrogenrezeptorabhängigen Reportergens kooperieren. PRMT4 stimuliert die ATPase-Aktivität von BRG1 und verstärkt damit die Remodellingaktivität des NUMAC-Komplexes. Andererseits beeinflussen die SWI/SNF-Remodeller die katalytische Aktivität von PRMT4. Liegt PRMT4 im NUMAC-Komplex vor, ändert sich die Substratspezifität der PRMT von freien Histonen hin zu Nukleosomen (Xu et al. 2004). Da solch ein Mechanismus auch für Mi-2 und PRMT4 denkbar wäre, wurde in unserer Arbeitsgruppe der Einfluss von Mi-2 α auf die Methylierungsaktivität von PRMT4 auf Kern-Histone und PABP1 untersucht. Es konnte jedoch keine Änderung in der Substratspezifität festgestellt werden (Diplomarbeit Marc Zeller, 2008). Der Einfluss von PRMT4 auf die Remodellingaktivität von Mi-2 wurde bisher nicht untersucht. PRMT4 methyliert nicht nur Histon H3, sondern auch andere Nicht-Histon Proteine (Bedford and Clarke 2009). Zum Beispiel wird CBP durch PRMT4 methyliert und dadurch in seiner HAT-Aktivität stimuliert (Chevallard-Briet et al. 2002; Wei et al. 2003). Für die p160-Faktoren wurde gezeigt, dass eine Methylierung dieser Faktoren durch PRMT4 einen Zerfall des Coaktivorkomplexes an durch den Estrogenrezeptor regulierten Genen bewirkt (Feng et al. 2006; Naeem et al. 2007). Jüngste Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass Mi-2 methyliert wird. Dies könnte regulatorisch auf die enzymatische Aktivität, die Bindung an das Chromatin oder die Assoziation von Mi-2 mit anderen Proteinen wirken. Eine weitere Möglichkeit der Kooperation könnte sein, dass das Zusammenwirken von PRMT4 und Mi-2 eine lokale Dekondensation des Chromatins bewirkt und dadurch die Rekrutierung von c-Myb an benachbarte Myb-Bindestellen der DNA begünstigt.

6.3.6. PRMT1 kooperiert nicht mit PRMT4 in der c-Myb-vermittelten Genexpression

Anhand von GST-Pulldown-Assays wurde festgestellt, dass neben PRMT4 auch PRMT1 schwach mit Mi-2 α interagiert (Diplomarbeit Sophia Teichmann, AG Bauer 2006). In der vorgelegten Arbeit wurde eine Interaktion zwischen c-Myb und PRMT4 und eine schwache Interaktion mit PRMT1 beobachtet. Cotransfektions-Assays in HD11-Zellen zeigten jedoch, dass ausschließlich PRMT4 und nicht PRMT1 in der Lage ist, die c-Myb-vermittelte Genexpression zu verstärken. Im Gegensatz zu der oftmals beschriebenen transkriptionellen Kooperativität zwischen PRMT4 und PRMT1 wirkt PRMT4 in der transkriptionellen Coaktivierung von c-Myb nicht kooperativ mit PRMT1.

6.3.7. Die Funktion von C/EBP in der c-Myb-vermittelten mim-1-Expression

Die c-Myb-regulierten Gene mim-1 und Lysozym werden ausschließlich in myeloischen Zellen transkribiert, obwohl c-Myb in nahezu allen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird. Der Transkriptionsfaktor C/EBP β wird in myeloischen Zellen und Makrophagen exprimiert und für die Expression von mim-1 und Lysozym in diesen Zellen verantwortlich gemacht (Burk et al. 1993; Ness et al. 1993). Die ektopische Expression von Myb und C/EBP reicht aus, um die Expression von mim-1 und Lysozym in erythroiden Zellen und Fibroblastenzellen wiederherzustellen (Burk et al. 1993; Ness et al. 1993). C/EBP β bindet zusammen mit Myb an den Promotor und Enhancer des mim-1-Gens und kooperiert mit c-Myb in der Transkription von mim-1 (Burk et al. 1993; Ness et al. 1993; Chayka et al. 2005). Dabei bewirkt C/EBP β die Öffnung des Chromatins und die Acetylierung von Histonen am Enhancer. Die Transkription des mim-1-Gens erfolgt nur zusammen mit Myb, indem Myb in Abhängigkeit von C/EBP β die Öffnung des Chromatins am Promotor bewirkt (Plachetka et al. 2008). Vermutlich bewirkt C/EBP β die Öffnung des Chromatins durch eine Interaktion mit dem SWI/SNF-Komplex (Kowenz-Leutz and Leutz 1999; Plachetka et al. 2008).

Die Coaktivierung des mim-1-Gens wurde in der Fibroblastenlinie QT6 analysiert, um zu untersuchen, ob die transkriptionelle Kooperation von PRMT4 und Mi-2 in der mim-1-Expression durch den Transkriptionsfaktor C/EBP β oder durch das Zusammenspiel von C/EBP β und c-Myb vermittelt wird. Wie erwartet war c-Myb selbst nicht in der Lage die mim-1-Transkription auszulösen. C/EBP β hingegen bewirkte eine schwache transkriptionelle Induktion von mim-1, die nicht durch Cotransfektion von Mi-2 α und PRMT4 verstärkt werden konnte. Erst wenn C/EBP β und c-Myb zusammen vorlagen, wurde mim-1 effizient

transkribiert. Die Cotransfektion von Mi-2 α oder PRMT4 bewirkte zwar eine schwache transkriptionelle Coaktivierung der mim-1 Expression, jedoch wirkten beide Faktoren nicht synergistisch wie es zuvor in HD11-Zellen beobachtet werden konnte. Es ist daher anzunehmen, dass in QT6-Zellen andere Faktoren fehlen, die in die Regulation des mim-1-Gens involviert sind. Diese Annahme wird durch eine Beobachtung von Klempnauer und Mitarbeitern unterstützt. Diese fanden heraus, dass der Enhancer des mim-1-Gens in QT6 Zellen im Gegensatz zu HD11-Zellen nicht aktivierbar ist (Chayka et al. 2005). Eine andere Studie zeigte, dass der Faktor Ets-2, ähnlich wie C/EBP β , die transkriptionelle Aktivierung von mim-1 durch c-Myb bewirkt (Dudek et al. 1992). Die transkriptionelle Aktivität von c-Myb durch PRMT4 und Mi-2 ist folglich zelltypspezifisch, da sie von der Ausstattung der Zellen mit bestimmten Faktoren abhängt.

6.4. PRMT4 und Mi-2 sind biologisch relevant

6.4.1. PRMT4 und Mi-2 regulieren die Proliferation in einer hämatopoetischen Zelllinie

Da c-Myb für den Erhalt der Proliferation wichtig ist und eine direkte Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von PRMT4 und Mi-2 auf die Proliferation untersucht (Gewirtz and Calabretta 1988; Anfossi et al. 1989; Citro et al. 1994). In K562-Zellen wurde eine reduzierte Koloniebildung nach *knockdown* von c-Myb, PRMT4, Mi-2 α und Mi-2 β beobachtet. Dabei bewirkte der Verlust von c-Myb und PRMT4 eine Hemmung des Koloniewachstums um 25-30 %. Der Verlust von Mi-2 β führte zu einem dramatischen Verlust von 70 % der Kolonien. In den Wachstumskurven inhibierte nur der Verlust von Mi-2 β die Proliferation der Zellen. In der Literatur wurde hingegen mit einem stabilen *knockdown* von c-Myb in K562-Zellen eine verminderte Proliferation in Flüssigkultur beschrieben (Kamano et al. 1990). Vermutlich reichte ein transienter *knockdown* von c-Myb in dem in dieser Arbeit durchgeführten Experiment nicht aus, um einen Effekt auf die Proliferation in Flüssigkultur zu beobachten.

Es war publiziert, dass die Induktion einer dominant negativen c-Myb-Mutante in K562-Zellen zu einer verminderten Koloniebildung führt und mit einem Zellzyklusarrest im Übergang von der G1 in die S-Phase einhergeht (Shetzline et al. 2004). Eine andere Studie zeigte wiederum, dass ein siRNA-vermittelter *knockdown* in K562-Zellen einen Arrest in der G2/M-Phase und eine Verzögerung im Durchlaufen der S-Phase zur Folge hat (Nakata et al. 2007). Um die Ursache der beobachteten Proliferationseffekte zu untersuchen, wurde das

Zellzyklusprofil von K562-Zellen analysiert. Im *knockdown* von c-Myb, PRMT4, Mi-2 α und Mi-2 β arretierte ein Anteil der Zellen in der G2/M-Phase, wie es zuvor von Nakata et al. 2007 für einen c-Myb-*knockdown* beschrieben wurde. Der Anteil der Zellen in der G1-Phase nahm ab. Es ist anzunehmen, dass c-Myb zusätzlich zu denen in dieser Arbeit untersuchten Genen die Transkription vieler weiterer Gene vermittelt, die für die Regulation des Zellzyklus verantwortlich sein könnten. Neben der Deregulation des Zellzyklus wurde eine Zunahme des Sub-G1 nach *knockdown* von c-Myb, PRMT4 und Mi-2 α festgestellt. Im *knockdown* von Mi-2 β befanden sich sogar 25 % der Zellen im Sub-G1. Die beobachteten Wachstumseffekte durch c-Myb, PRMT4 und Mi-2 können folglich auf einen Arrest in der G2/M-Phase und vermutlich auf eine Zunahme der Apoptose zurückgeführt werden. Da Mi-2 β stärker auf die Proliferation und den Zellzyklus wirkt als c-Myb, ist anzunehmen, dass Mi-2 β nicht nur ein Regulator von c-Myb ist, sondern darüber hinaus über c-Myb-unabhängige Mechanismen wirkt.

6.4.2. PRMT4 und Mi-2 sind an der Regulation der erythroiden Differenzierung beteiligt

C-Myb ist ein wichtiger Regulator der Differenzierung hämatopoetischer Zellen. Aus der Literatur war bekannt, dass eine konstitutive Expression von c-Myb zu einem Block der erythroiden Differenzierung von K562-Zellen führt (Rosson and O'Brien 1995). Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von PRMT4, Mi-2 α und Mi-2 β auf die erythroide Differenzierung von K562-Zellen im Vergleich zu c-Myb untersucht. In der Literatur wurde zuvor gezeigt, dass eine Reduktion der Proteinmenge von c-Myb für die erythroide Differenzierung von K562-Zellen nötig ist (Rosson and O'Brien 1995). Zunächst konnte beobachtet werden, dass c-Myb und die Coregulatoren PRMT4 und Mi-2 in ihrer Proteinexpression nach Ara-C-Behandlung herunterreguliert werden. Da das Zytostatika Ara-C eine irreversible Differenzierung von K562-Zellen bewirkt aber auch DNA-Schaden auslöst, kann der Verlust der Faktoren nicht ausschließlich auf Differenzierungsprozesse zurückgeführt werden (Luisi-DeLuca et al. 1984). Für die Behandlung von K562-Zellen mit Hemin war bekannt, dass die Substanz die mRNA-Menge von c-Myb reduziert (Sasaki et al. 1994). In Übereinstimmung damit konnte eine Reduktion der Proteinmengen von c-Myb aber auch von Mi-2 durch Hemin nachgewiesen werden. Es wurde festgestellt, dass der *knockdown* von c-Myb bzw. Mi-2 β in K562-Zellen eine spontane erythroide Differenzierung eines Anteils der Zellpopulation bewirkt. Die Zellen wurden mit Hemin behandelt, um die erythroide Differenzierung voranzutreiben. Unter

diesen Bedingungen gingen die Zellen auch im *knockdown* von PRMT4 und Mi-2 α stärker in die Differenzierung als die Kontrollzellen. Der Einfluss von PRMT4 und Mi-2 α auf die Differenzierung war schwächer als der von c-Myb oder Mi-2 β . Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Mi-2 und PRMT4 als transkriptionelle Coregulatoren von c-Myb für den Erhalt des Progenitorstatus hämatopoetischer Zellen eine Rolle spielen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch nicht bewiesen, dass die biologischen Effekte von PRMT4 und Mi-2 tatsächlich c-Myb-abhängig sind. Vermutlich sind PRMT4 und Mi-2 als transkriptionelle Coaktivatoren von c-Myb Regulatoren und Modulatoren c-Myb-vermittelter biologischen Funktionen wie der Proliferation, dem Zellzyklus und dem Erhalt des Progenitorstatus und sind damit an der Regulation der Erythropoese beteiligt.

Es gibt in der Literatur Hinweise dafür, dass Mi-2 β ein Regulator der Hämatopoese ist. Kürzlich wurde beschrieben, dass Mi-2 β wichtig für den Erhalt der Selbsterneuerungskapazität und der Multipotenz von hämatopoetischen Stammzellen (*multilineage differentiation*) ist. Die konditionale Inaktivierung von Mi-2 β führte erst zu einer schnellen Expansion hämatopoetischer Stammzellen (HSC), einer Anreicherung erythroider Vorläuferzellen und einem Verlust myeloider Vorläuferzellen. Zu einem späteren Zeitpunkt kam es zu einem vollständigen Verlust aller HSC und Vorläuferzellen während es zu einer Akkumulation von Proerythroblasten kam (Yoshida et al. 2008). Eine andere Studie zeigte, dass Mi-2 β in einem Proteinkomplex mit GATA1 und FOG1 (*Friend of GATA*) für Repression eines γ -Globins während der adulten Erythropoese verantwortlich ist (Hong et al. 2005; Harju-Baker et al. 2008). Diese Daten unterstützen den Befund, dass ein Verlust von Mi-2 β die erythroide Differenzierung vorantreibt. Es könnte sein, dass der in dieser Arbeit beobachtete Effekt von Mi-2 β auf die Hämoglobinsynthese in K562-Zellen auf einen Verlust der Repression des γ -Globins durch Mi-2 β zurückzuführen ist.

6.4.3. PRMT4 und Mi-2 als Regulatoren von c-Myb in der Hämatopoese

In der erythroiden Zelllinie K562 korrelieren die biologischen Funktionen von PRMT4, Mi-2 α und Mi-2 β mit denen von c-Myb. Da c-Myb nicht nur in erythroiden Zellen, sondern in allen hämatopoetischen Linien relevant ist (Abb. 50), lässt sich eine weitreichende Rolle für PRMT4 und Mi-2 in der Hämatopoese erahnen.

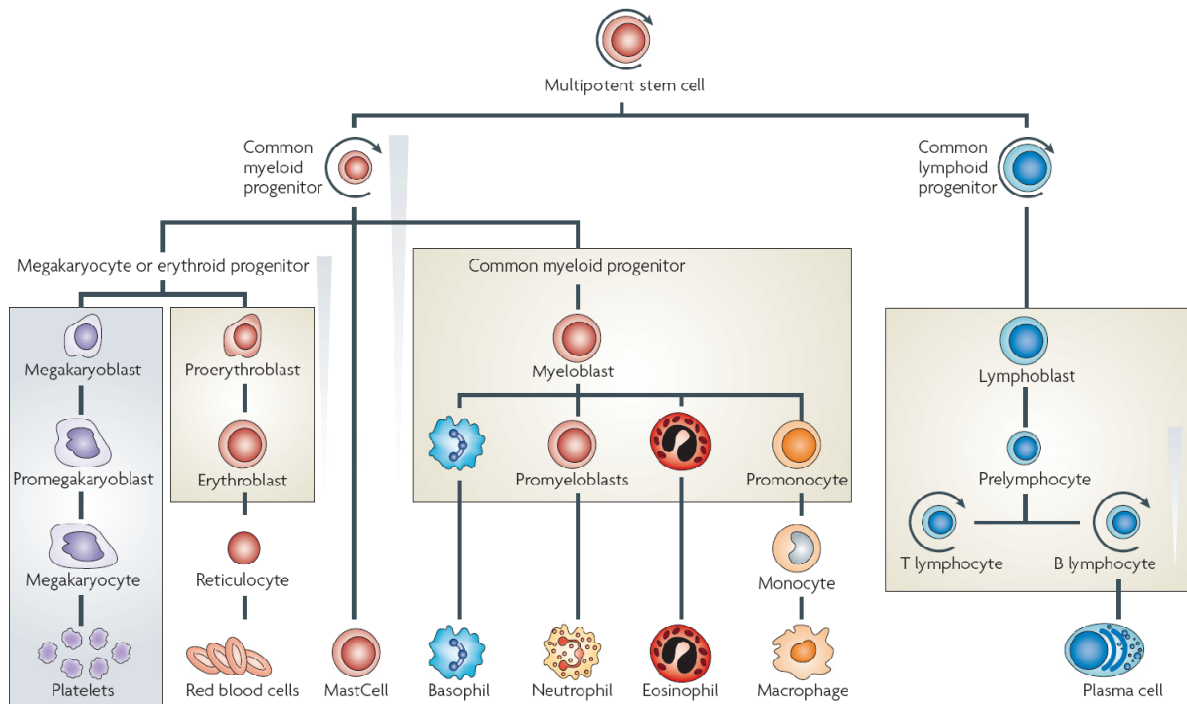


Abb. 50 c-Myb in der adulten Hämatopoese

Die Linien des hämatopoetischen Systems sind dargestellt. Die grauen Keile repräsentieren die Proteinexpression von c-Myb. Diese ist in den Progenitorzellen besonders hoch, da c-Myb für die Selbsterneuerung notwendig ist (runde Pfeile). Zelllinien, deren Differenzierung durch eine Überexpression von c-Myb gehemmt wird, sind mit beige Boxen unterlegt. Die Megakaryozyten-Linie stellt eine Ausnahme dar, da der Verlust von c-Myb die Expansion der Megakaryoblasten und die Bildung der Plättchen begünstigt (blaue Box), (Ramsay and Gonda 2008).

C-Myb ist unter anderem für die Selbsterneuerung von lymphoiden Progenitorzellen und während der voranschreitenden Differenzierung von T- und B-Lymphozyten wichtig. Für PRMT4 wurde eine Rolle während der frühen T-Zelldifferenzierung beschrieben. PRMT4 *knockout*-Mäuse haben eine verminderte Thymozytenzahl auf Grund eines Defektes beim Übergang vom doppelt-negativen Stadium DN1 zu DN2 (Kim et al. 2004). Eine Funktion von PRMT4 auf die spätere Differenzierung von T-Lymphozyten nach dem Übergang von DN1 in DN2 konnte in dieser Studie nicht untersucht werden. Ein konditionaler *knockout* von Mi-2 β im DN-Stadium der T-Lymphozytenzellen zeigte, dass Mi-2 β an mehreren Punkten der Differenzierung eingreift. Mi-2 β ist für den Übergang vom doppelt-negativen zum doppelt-positiven Stadium (DP), für die Expression des Corezeptors CD4 im DP-Stadium und für die proliferative Expansion von reifen T-Zellen notwendig (Williams et al. 2004). Interessanterweise wurde in der vorgelegten Arbeit das c-Myb-Zielgen GATA3, das einen T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor codiert, als ein durch c-Myb, PRMT4, Mi2 α und Mi-2 β aktiviertes Gen identifiziert. GATA3 ist für die frühe T-Lymphozyten-Differenzierung und für

die Entwicklung CD4-positiver T-Zellen essentiell (Ho et al. 2009). Die Regulation von GATA3 durch c-Myb, PRMT4 und Mi-2 könnte ein Hinweis auf eine gemeinsame Funktion der Faktoren in der T-Zelldifferenzierung sein.

6.4.4. PRMTs in der Entstehung von Leukämien

Für PRMT1 und PRMT5 gibt es erste Hinweise auf einen Zusammenhang mit der Entstehung von Leukämien. Eine Studie zeigt, dass die Proteinmenge von PRMT5 in lymphatischen Krebszelllinien und in klinischen Mantelzelllymphoma-Proben (B-Zell-Lymphom) erhöht ist und PRMT5 zur Transformation lymphatischer B- und T-Zelllinien beiträgt (Pal et al. 2007). PRMT1 ist für das onkogene Potential des Fusionsproteins MLL-EEN wichtig und somit vermutlich an der Entstehung von AML (akute myeloische Leukämie) beteiligt. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass PRMT4 nicht zur MLL-EEN-induzierten Transformation beiträgt und daher keine Rolle bei der MLL-EEN-induzierten Entstehung der AML spielt (Cheung et al. 2007). Bisher ist nicht bekannt, ob PRMT4 auf hämatopoetische Zellen transformierend wirkt. Die Zelllinie K562 wurde aus einer CML-Patientin in der Blastenkrise isoliert und trägt das Onkogen Bcr-Abl. Aus der Literatur ist bekannt, dass c-Myb an der Transformation durch Bcr-Abl während der Leukämogenese beteiligt ist (Lidonnici et al. 2008). Da PRMT4 und Mi-2 die Proliferation vorantreiben und Differenzierungsprozessen entgegenwirken, könnten beide Proteine als Coaktivatoren von c-Myb an der Transformation von Zellen beteiligt sein.

6.5. Modell für die Regulation der c-Myb-abhängigen Genexpression durch PRMT4 und Mi-2

Im Folgenden wird ein Modell zur Regulation von c-Myb-Zielgenen vorgeschlagen (Abb. 51): Der Transkriptionsfaktor c-Myb bindet sequenzspezifisch an die Promotoren seiner Zielgene. Die Coaktivatoren PRMT4 und Mi-2 werden durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor c-Myb an die Myb-Bindestellen der Zielgene rekrutiert. Die Histonacetyltransferase CBP ist ebenfalls ein transkriptioneller Coaktivator und Interaktionspartner von c-Myb (Oelgeschläger et al. 1996). Mit der SANT-Domäne bindet c-Myb den N-Terminus von Histon H3 und begünstigt damit die Acetylierung an Lysin K18 und K23 durch CBP (Mo et al. 2005). Dies stabilisiert die Assoziation von PRMT4 mit dem Chromatin und begünstigt die Methylierung von Histon H3 am R17 (Daujat et al. 2002). Die Methylierung von Histonen oder sogar die Methylierung von Mi-2 durch PRMT4 begünstigt die Remodelleraktivität von Mi-2 auf Nucleosomen in der Promotorregion des Gens.

Andererseits ist die Remodelleraktivität von Mi-2 notwendig für die Methylierungsaktivität von PRMT4. Dies führt zu einer synergistischen Kooperation beider Coaktivatoren in der c-Myb-abhängigen Transkription. Als transkriptionelle Regulatoren von c-Myb modulieren PRMT4 und Mi-2 die biologischen Funktionen von c-Myb und nehmen somit Einfluss auf die Proliferation und die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen.

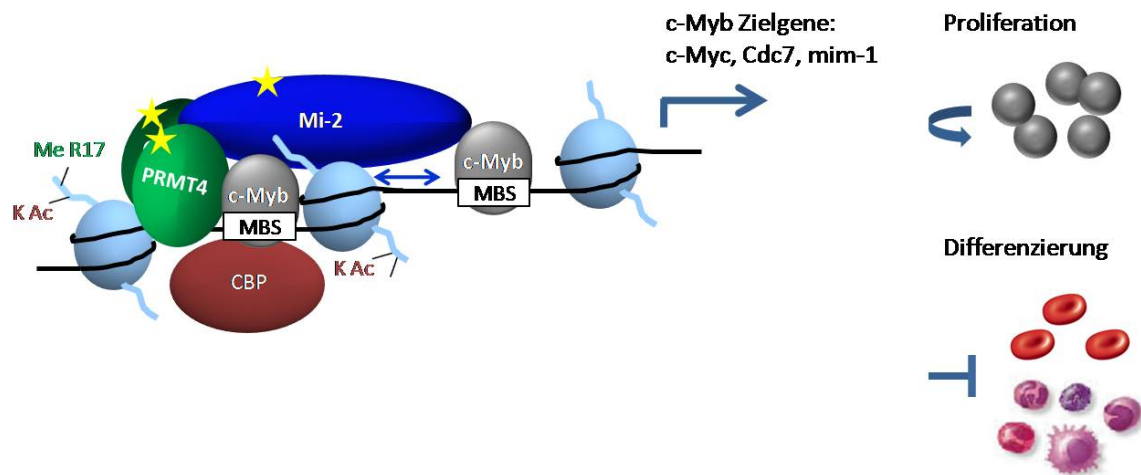


Abb. 51 Modell der kooperativen Aktivierung der c-Myb-abhängigen Genexpression durch PRMT4 und Mi-2

Die DNA mit Myb-Bindestellen (MBS) und Nukleosomen sind dargestellt. c-Myb bindet sequenzspezifisch an die DNA und rekrutiert die Coaktivatoren CBP, PRMT4 und Mi-2. CBP katalysiert die Acetylierung von Lysinen und PRMT4 die Methylierung von Arginin 17 des N-Terminus von Histon H3. Die katalytische Aktivität* von PRMT4 und Mi-2 ist für deren Kooperativität in der Regulation der c-Myb-abhängigen Genexpression notwendig. Der chromatinassoziierte Coaktivatorkomplex aktiviert c-Myb-Zielgene, die wiederum zu Proliferation beitragen und die Differenzierung regulieren.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADA	Adenosin Deaminase
AIB1	amplified in breast cancer-1
AR	Androgenrezeptor
Ara-C	Cytosinarabinosid
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
Brg1	brahma-related gene 1
CBP	CREB-Bindeprotein
CCNB1	CyclinB1
CDC7	cell division cycle 7 homolog
CHD	chromodomain helicase DNA binding protein
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CIITA	major histocompatibility complex, class II, transactivator
CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2
c-MYC	myelocytomatosis oncogene
CoIP	Coimmunpräzipitation
CREB	cAMP response element binding protein
E2F	E2 Promotor binding factor
ER	Estrogenrezeptor
FCS	fetal calf serum
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GATA3	GATA binding protein 3
GH	growth hormone
GR	Glucocorticoidrezeptor
h	Stunde
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
HEB	helix-loop-helix transcription factor 4
His-Tag	Hexahistidin-Tag
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G

IL-4	Interleukin 4
IP	Immunpräzipitation
JAK	Janus Kinase
kbp	Kilobasenpaare
KRT8	Keratin 8
LB	Luria Bertoni
min	Minuten
NF-AT	nuclear factor of activated T-cells
NFκ-B	nuclear factor κB
NGF	nerve growth factor
NMU	Neuromedin U
NR	nukleärer Hormonrezeptor
Nt	Nukleotid
NUMAC	nucleosomal methylation activator-Komplex
NuRD	nucleosome remodeling and deacetylase-Komplex
p300	E1A binding protein p300
PHD	Plant Homeo Domain
PI	Propidiumiodid
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PRMT	Proteinargininmethyltransferase
PTM	Posttranslationale Modifikation
RT-qPCR	Reverse Transkription und anschließende quantitative Polymerasekettenreaktion
SAM	S-Adenosylmethionin
siRNA	small interfering ribonucleic acid
STAT	signal transducer and activator of transcription
SWI/SNF	mating type switch sucrose non-fermenting
TCF-4/LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1
TR	Thyroidhormonrezeptor
YY1	YIN-YANG-1
α	anti

8. Literaturverzeichnis

- Abramovich, C., Yakobson, B., Chebath, J., and Revel, M. 1997. A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. *The EMBO journal* **16**(2): 260-266.
- Ahonen, T.J., Xie, J., LeBaron, M.J., Zhu, J., Nurmi, M., Alanen, K., Rui, H., and Nevalainen, M.T. 2003. Inhibition of transcription factor Stat5 induces cell death of human prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **278**(29): 27287-27292.
- Altschuler, L., Wook, J.O., Gurari, D., Chebath, J., and Revel, M. 1999. Involvement of receptor-bound protein methyltransferase PRMT1 in antiviral and antiproliferative effects of type I interferons. *J Interferon Cytokine Res* **19**(2): 189-195.
- An, W., Kim, J., and Roeder, R.G. 2004. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* **117**(6): 735-748.
- Ancelin, K., Lange, U.C., Hajkova, P., Schneider, R., Bannister, A.J., Kouzarides, T., and Surani, M.A. 2006. Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nature cell biology* **8**(6): 623-630.
- Anfossi, G., Gewirtz, A.M., and Calabretta, B. 1989. An oligomer complementary to c-myb-encoded mRNA inhibits proliferation of human myeloid leukemia cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**(9): 3379-3383.
- Armstrong, J.A., Papoulas, O., Daubresse, G., Sperling, A.S., Lis, J.T., Scott, M.P., and Tamkun, J.W. 2002. The Drosophila BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *The EMBO journal* **21**(19): 5245-5254.
- Bakker, W.J., van Dijk, T.B., Parren-van Amelsvoort, M., Kolbus, A., Yamamoto, K., Steinlein, P., Verhaak, R.G., Mak, T.W., Beug, H., Lowenberg, B., and von Lindern, M. 2007. Differential regulation of Foxo3a target genes in erythropoiesis. *Molecular and cellular biology* **27**(10): 3839-3854.
- Balint, B.L., Szanto, A., Madi, A., Bauer, U.M., Gabor, P., Benko, S., Puskas, L.G., Davies, P.J., and Nagy, L. 2005. Arginine methylation provides epigenetic transcription memory for retinoid-induced differentiation in myeloid cells. *Molecular and cellular biology* **25**(13): 5648-5663.
- Barrero, M.J. and Malik, S. 2006. Two functional modes of a nuclear receptor-recruited arginine methyltransferase in transcriptional activation. *Molecular cell* **24**(2): 233-243.
- Batsche, E., Yaniv, M., and Muchardt, C. 2006. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nature structural & molecular biology* **13**(1): 22-29.
- Bauer, U.M., Daujat, S., Nielsen, S.J., Nightingale, K., and Kouzarides, T. 2002. Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep* **3**(1): 39-44.
- Bedford, M.T. and Clarke, S.G. 2009. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Molecular cell* **33**(1): 1-13.
- Bedford, M.T. and Richard, S. 2005. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Molecular cell* **18**(3): 263-272.
- Bergad, P.L., Towle, H.C., and Berry, S.A. 2000. Yin-yang 1 and glucocorticoid receptor participate in the Stat5-mediated growth hormone response of the serine protease inhibitor 2.1 gene. *The Journal of biological chemistry* **275**(11): 8114-8120.

- Berge, T., Matre, V., Brendeford, E.M., Saether, T., Luscher, B., and Gabrielsen, O.S. 2007. Revisiting a selection of target genes for the hematopoietic transcription factor c-Myb using chromatin immunoprecipitation and c-Myb knockdown. *Blood cells, molecules & diseases* **39**(3): 278-286.
- Beug, H., von Kirchbach, A., Doderlein, G., Conscience, J.F., and Graf, T. 1979. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* **18**(2): 375-390.
- Bjornstrom, L., Kilic, E., Norman, M., Parker, M.G., and Sjoberg, M. 2001. Cross-talk between Stat5b and estrogen receptor-alpha and -beta in mammary epithelial cells. *Journal of molecular endocrinology* **27**(1): 93-106.
- Boffa, L.C., Karn, J., Vidali, G., and Allfrey, V.G. 1977. Distribution of NG, NG,-dimethylarginine in nuclear protein fractions. *Biochemical and biophysical research communications* **74**(3): 969-976.
- Boisvert, F.M. and Richard, S. 2004. Arginine methylation regulates the cytokine response. *Molecular cell* **15**(4): 492-494.
- Boyer, L.A., Langer, M.R., Crowley, K.A., Tan, S., Denu, J.M., and Peterson, C.L. 2002. Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Molecular cell* **10**(4): 935-942.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.
- Braganca, J., Swingler, T., Marques, F.I., Jones, T., Eloranta, J.J., Hurst, H.C., Shioda, T., and Bhattacharya, S. 2002. Human CREB-binding protein/p300-interacting transactivator with ED-rich tail (CITED) 4, a new member of the CITED family, functions as a co-activator for transcription factor AP-2. *The Journal of biological chemistry* **277**(10): 8559-8565.
- Burk, O., Mink, S., Ringwald, M., and Klempnauer, K.H. 1993. Synergistic activation of the chicken mim-1 gene by v-myb and C/EBP transcription factors. *The EMBO journal* **12**(5): 2027-2038.
- Cairns, B.R., Kim, Y.J., Sayre, M.H., Laurent, B.C., and Kornberg, R.D. 1994. A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(5): 1950-1954.
- Calnan, B., Tidor, B., Biancalana, S., Hudson, D., and Frankel, A. 1991. Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science (New York, NY)* **252**(5009): 1167-1171.
- Chadwick, B.P. and Willard, H.F. 2004. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(50): 17450-17455.
- Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. 2007. JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science (New York, NY)* **318**(5849): 444-447.
- Chayka, O., Kintscher, J., Braas, D., and Klempnauer, K.H. 2005. v-Myb mediates cooperation of a cell-specific enhancer with the mim-1 Promotor. *Molecular and cellular biology* **25**(1): 499-511.

- Chen, D., Huang, S.M., and Stallcup, M.R. 2000. Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *J Biol Chem* **275**(52): 40810-40816.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W., and Stallcup, M.R. 1999. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science (New York, NY)* **284**(5423): 2174-2177.
- Chen, S.L., Loffler, K.A., Chen, D., Stallcup, M.R., and Muscat, G.E. 2002. The coactivator-associated arginine methyltransferase is necessary for muscle differentiation: CARM1 coactivates myocyte enhancer factor-2. *J Biol Chem* **277**(6): 4324-4333.
- Cheng, D., Cote, J., Shaaban, S., and Bedford, M.T. 2007. The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing. *Molecular cell* **25**(1): 71-83.
- Cheng, X., Collins, R.E., and Zhang, X. 2005. Structural and sequence motifs of protein (histone) methylation enzymes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **34**: 267-294.
- Cheung, N., Chan, L.C., Thompson, A., Cleary, M.L., and So, C.W. 2007. Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis. *Nature cell biology* **9**(10): 1208-1215.
- Chevillard-Briet, M., Trouche, D., and Vandel, L. 2002. Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *The EMBO journal* **21**(20): 5457-5466.
- Choi, H.K., Choi, K.C., Oh, S.Y., Kang, H.B., Lee, Y.H., Haam, S., Ahn, Y.H., Kim, K.S., Kim, K., and Yoon, H.G. 2007. The functional role of the CARM1-SNF5 complex and its associated HMT activity in transcriptional activation by thyroid hormone receptor. *Exp Mol Med* **39**(4): 544-555.
- Citro, G., Szczylik, C., Ginobbi, P., Zupi, G., and Calabretta, B. 1994. Inhibition of leukaemia cell proliferation by folic acid-polylysine-mediated introduction of c-myc antisense oligodeoxynucleotides into HL-60 cells. *British journal of cancer* **69**(3): 463-467.
- Clapier, C.R. and Cairns, B.R. 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry* **78**: 273-304.
- Collins, S.J., Gallo, R.C., and Gallagher, R.E. 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270**(5635): 347-349.
- Corradini, F., Cesi, V., Bartella, V., Pani, E., Bussolari, R., Candini, O., and Calabretta, B. 2005. Enhanced proliferative potential of hematopoietic cells expressing degradation-resistant c-Myb mutants. *The Journal of biological chemistry* **280**(34): 30254-30262.
- Cote, J. and Richard, S. 2005. Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines. *The Journal of biological chemistry* **280**(31): 28476-28483.
- Covic, M., Hassa, P.O., Sacconi, S., Buerki, C., Meier, N.I., Lombardi, C., Imhof, R., Bedford, M.T., Natoli, G., and Hottiger, M.O. 2005. Arginine methyltransferase CARM1 is a Promotor-specific regulator of NF-kappaB-dependent gene expression. *EMBO J* **24**(1): 85-96.
- Dacwag, C.S., Bedford, M.T., Sif, S., and Imbalzano, A.N. 2009. Distinct protein arginine methyltransferases promote ATP-dependent chromatin remodeling function at different stages of skeletal muscle differentiation. *Mol Cell Biol* **29**(7): 1909-1921.
- Dacwag, C.S., Ohkawa, Y., Pal, S., Sif, S., and Imbalzano, A.N. 2007. The protein arginine methyltransferase Prmt5 is required for myogenesis because it facilitates ATP-dependent chromatin remodeling. *Molecular and cellular biology* **27**(1): 384-394.

- Dahle, O., Andersen, T.O., Nordgard, O., Matre, V., Del Sal, G., and Gabrielsen, O.S. 2003. Transactivation properties of c-Myb are critically dependent on two SUMO-1 acceptor sites that are conjugated in a PIASy enhanced manner. *European journal of biochemistry / FEBS* **270**(6): 1338-1348.
- Daujat, S., Bauer, U.M., Shah, V., Turner, B., Berger, S., and Kouzarides, T. 2002. Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr Biol* **12**(24): 2090-2097.
- Dean, A., Erard, F., Schneider, A.P., and Schechter, A.N. 1981. Induction of hemoglobin accumulation in human K562 cells by hemin is reversible. *Science (New York, NY)* **212**(4493): 459-461.
- Dean, A., Ley, T.J., Humphries, R.K., Fordis, M., and Schechter, A.N. 1983. Inducible transcription of five globin genes in K562 human leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**(18): 5515-5519.
- Denslow, S.A. and Wade, P.A. 2007. The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* **26**(37): 5433-5438.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., and Roeder, R.G. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic acids research* **11**(5): 1475-1489.
- Dror, V. and Winston, F. 2004. The Swi/Snf chromatin remodeling complex is required for ribosomal DNA and telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **24**(18): 8227-8235.
- Dudek, H., Tantravahi, R.V., Rao, V.N., Reddy, E.S., and Reddy, E.P. 1992. Myb and Ets proteins cooperate in transcriptional activation of the mim-1 Promotor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(4): 1291-1295.
- Eisbruch, A., Blick, M., Evinger-Hodges, M.J., Beran, M., Andersson, B., Gutterman, J.U., and Kurzrock, R. 1988. Effect of differentiation-inducing agents on oncogene expression in a chronic myelogenous leukemia cell line. *Cancer* **62**(6): 1171-1178.
- El Messaoudi, S., Fabbrizio, E., Rodriguez, C., Chuchana, P., Fauquier, L., Cheng, D., Theillet, C., Vandel, L., Bedford, M.T., and Sardet, C. 2006. Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the Cyclin E1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(36): 13351-13356.
- Feng, Q., He, B., Jung, S.Y., Song, Y., Qin, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. 2009. Biochemical control of CARM1 enzymatic activity by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **284**(52): 36167-36174.
- Feng, Q., Yi, P., Wong, J., and O'Malley, B.W. 2006. Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol Cell Biol* **26**(21): 7846-7857.
- Feng, Q. and Zhang, Y. 2001. The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes & development* **15**(7): 827-832.
- Flanagan, J.F., Mi, L.Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., and Khorasanizadeh, S. 2005. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* **438**(7071): 1181-1185.

- Frankel, A., Yadav, N., Lee, J., Branscombe, T.L., Clarke, S., and Bedford, M.T. 2002. The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* **277**(5): 3537-3543.
- Friesen, W.J., Wyce, A., Paushkin, S., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. 2002. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *The Journal of biological chemistry* **277**(10): 8243-8247.
- Frietze, S., Lupien, M., Silver, P.A., and Brown, M. 2008. CARM1 regulates estrogen-stimulated breast cancer growth through up-regulation of E2F1. *Cancer research* **68**(1): 301-306.
- Fryer, C.J. and Archer, T.K. 1998. Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* **393**(6680): 88-91.
- Fu, S.L. and Lipsick, J.S. 1996. FAETL motif required for leukemic transformation by v-Myb. *Journal of virology* **70**(8): 5600-5610.
- Fujiwara, T., Mori, Y., Chu, D.L., Koyama, Y., Miyata, S., Tanaka, H., Yachi, K., Kubo, T., Yoshikawa, H., and Tohyama, M. 2006. CARM1 regulates proliferation of PC12 cells by methylating HuD. *Molecular and cellular biology* **26**(6): 2273-2285.
- Ganesh, L., Yoshimoto, T., Moorthy, N.C., Akahata, W., Boehm, M., Nabel, E.G., and Nabel, G.J. 2006. Protein methyltransferase 2 inhibits NF-kappaB function and promotes apoptosis. *Molecular and cellular biology* **26**(10): 3864-3874.
- Gangaraju, V.K. and Bartholomew, B. 2007. Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutation research* **618**(1-2): 3-17.
- Gewirtz, A.M. and Calabretta, B. 1988. A c-myb antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis in vitro. *Science (New York, NY)* **242**(4883): 1303-1306.
- Ghosh, S.K., Paik, W.K., and Kim, S. 1988. Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein- and histone-specific enzyme. *The Journal of biological chemistry* **263**(35): 19024-19033.
- Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L., and Workman, J.L. 1997. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & development* **11**(13): 1640-1650.
- Greig, K.T., Carotta, S., and Nutt, S.L. 2008. Critical roles for c-Myb in hematopoietic progenitor cells. *Seminars in immunology* **20**(4): 247-256.
- Guccione, E., Bassi, C., Casadio, F., Martinato, F., Cesaroni, M., Schuchlautz, H., Luscher, B., and Amati, B. 2007. Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* **449**(7164): 933-937.
- Hall, J.A. and Georgel, P.T. 2007. CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **85**(4): 463-476.
- Harju-Baker, S., Costa, F.C., Fedosyuk, H., Neades, R., and Peterson, K.R. 2008. Silencing of Agamma-globin gene expression during adult definitive erythropoiesis mediated by GATA-1-FOG-1-Mi2 complex binding at the -566 GATA site. *Molecular and cellular biology* **28**(10): 3101-3113.
- Hassa, P.O., Covic, M., Bedford, M.T., and Hottiger, M.O. 2008. Protein arginine methyltransferase 1 coactivates NF-kappaB-dependent gene expression synergistically with CARM1 and PARP1. *J Mol Biol* **377**(3): 668-678.

- Hennighausen, L. and Robinson, G.W. 2008. Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes & development* **22**(6): 711-721.
- Henry, M.F. and Silver, P.A. 1996. A novel methyltransferase (Hmt1p) modifies poly(A)⁺-RNA-binding proteins. *Molecular and cellular biology* **16**(7): 3668-3678.
- Herrmann, F., Pably, P., Eckerich, C., Bedford, M.T., and Fackelmayer, F.O. 2009. Human protein arginine methyltransferases in vivo--distinct properties of eight canonical members of the PRMT family. *Journal of cell science* **122**(Pt 5): 667-677.
- Hidaka, Y., Hagiwara, T., and Yamada, M. 2005. Methylation of the guanidino group of arginine residues prevents citrullination by peptidylarginine deiminase IV. *FEBS letters* **579**(19): 4088-4092.
- Higashimoto, K., Kuhn, P., Desai, D., Cheng, X., and Xu, W. 2007. Phosphorylation-mediated inactivation of coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(30): 12318-12323.
- Ho, P.C., Lin, Y.W., Tsui, Y.C., Gupta, P., and Wei, L.N. 2009. A negative regulatory pathway of GLUT4 trafficking in adipocyte: new function of RIP140 in the cytoplasm via AS160. *Cell metabolism* **10**(6): 516-523.
- Hong, H., Kao, C., Jeng, M.H., Eble, J.N., Koch, M.O., Gardner, T.A., Zhang, S., Li, L., Pan, C.X., Hu, Z., MacLennan, G.T., and Cheng, L. 2004. Aberrant expression of CARM1, a transcriptional coactivator of androgen receptor, in the development of prostate carcinoma and androgen-independent status. *Cancer* **101**(1): 83-89.
- Hong, W., Nakazawa, M., Chen, Y.Y., Kori, R., Vakoc, C.R., Rakowski, C., and Blobel, G.A. 2005. FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *The EMBO journal* **24**(13): 2367-2378.
- Hou, J., Schindler, U., Henzel, W.J., Ho, T.C., Bressan, M., and McKnight, S.L. 1994. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science (New York, NY)* **265**(5179): 1701-1706.
- Hou, Z., Peng, H., Ayyanathan, K., Yan, K.P., Langer, E.M., Longmore, G.D., and Rauscher, F.J., 3rd. 2008. The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression. *Molecular and cellular biology* **28**(10): 3198-3207.
- Hsiao, P.W., Fryer, C.J., Trotter, K.W., Wang, W., and Archer, T.K. 2003. BAF60a mediates critical interactions between nuclear receptors and the BRG1 chromatin-remodeling complex for transactivation. *Molecular and cellular biology* **23**(17): 6210-6220.
- Huang, S., Litt, M., and Felsenfeld, G. 2005. Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. *Genes & development* **19**(16): 1885-1893.
- Huang, Z.Q., Li, J., Sachs, L.M., Cole, P.A., and Wong, J. 2003. A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription. *The EMBO journal* **22**(9): 2146-2155.
- Hughes, R.M. and Waters, M.L. 2006. Arginine methylation in a beta-hairpin peptide: implications for Arg-pi interactions, DeltaCp(o), and the cold denatured state. *Journal of the American Chemical Society* **128**(39): 12735-12742.
- Hyllus, D., Stein, C., Schnabel, K., Schiltz, E., Imhof, A., Dou, Y., Hsieh, J., and Bauer, U.M. 2007. PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes & development* **21**(24): 3369-3380.

- Iberg, A.N., Espejo, A., Cheng, D., Kim, D., Michaud-Levesque, J., Richard, S., and Bedford, M.T. 2008. Arginine methylation of the histone H3 tail impedes effector binding. *The Journal of biological chemistry* **283**(6): 3006-3010.
- Igarashi, H., Kuwahara, K., Yoshida, M., Xing, Y., Maeda, K., Nakajima, K., and Sakaguchi, N. 2009. GANP suppresses the arginine methyltransferase PRMT5 regulating IL-4-mediated STAT6-signaling to IgE production in B cells. *Molecular immunology* **46**(6): 1031-1041.
- Imada, K., Bloom, E.T., Nakajima, H., Horvath-Arcidiacono, J.A., Udy, G.B., Davey, H.W., and Leonard, W.J. 1998. Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. *The Journal of experimental medicine* **188**(11): 2067-2074.
- Introna, M., Golay, J., Frampton, J., Nakano, T., Ness, S.A., and Graf, T. 1990. Mutations in v-myb alter the differentiation of myelomonocytic cells transformed by the oncogene. *Cell* **63**(6): 1289-1297.
- Ito, T., Yadav, N., Lee, J., Furumatsu, T., Yamashita, S., Yoshida, K., Taniguchi, N., Hashimoto, M., Tsuchiya, M., Ozaki, T., Lotz, M., Bedford, M.T., and Asahara, H. 2009. Arginine methyltransferase CARM1/PRMT4 regulates endochondral ossification. *BMC developmental biology* **9**: 47.
- Ivanova, O., Braas, D., and Klempnauer, K.H. 2007. Oncogenic point mutations in the Myb DNA-binding domain alter the DNA-binding properties of Myb at a physiological target gene. *Nucleic acids research* **35**(21): 7237-7247.
- Jelinic, P., Stehle, J.C., and Shaw, P. 2006. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS biology* **4**(11): e355.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. 2001. Translating the histone code. *Science (New York, NY)* **293**(5532): 1074-1080.
- Jia, C.P., Chen, M.J., Huang, S.Z., and Zeng, Y.T. 2002. [A study of inductive effect of hemin on expression of the beta-globin genes in K562 cells]. *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji* **24**(4): 399-402.
- Jiang, J., Best, S., Menzel, S., Silver, N., Lai, M.I., Surdulescu, G.L., Spector, T.D., and Thein, S.L. 2006. cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. *Blood* **108**(3): 1077-1083.
- Kamano, H., Ohnishi, H., Tanaka, T., Ikeda, K., Okabe, A., and Irino, S. 1990. Effects of the antisense v-myb' expression on K562 human leukemia cell proliferation and differentiation. *Leukemia research* **14**(10): 831-839.
- Kaminski, A., Welters, H.J., Kaminski, E.R., and Morgan, N.G. Human and rodent pancreatic beta-cells express IL-4 receptors and IL-4 protects against beta-cell apoptosis by activation of the PI3K and JAK/STAT pathways. *Bioscience reports* **30**(3): 169-175.
- Kim, D., Lee, J., Cheng, D., Li, J., Carter, C., Richie, E., and Bedford, M.T. 2009. Enzymatic Activity Is Required for the in Vivo Functions of the Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1. *J Biol Chem*.
- Kim, J., Lee, J., Yadav, N., Wu, Q., Carter, C., Richard, S., Richie, E., and Bedford, M.T. 2004. Loss of CARM1 results in hypomethylation of thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein and deregulated early T cell development. *The Journal of biological chemistry* **279**(24): 25339-25344.

- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R., and Georgopoulos, K. 1999. Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* **10**(3): 345-355.
- Kim, J.H., Yang, C.K., and Stallcup, M.R. 2006. Downstream signaling mechanism of the C-terminal activation domain of transcriptional coactivator CoCoA. *Nucleic Acids Res* **34**(9): 2736-2750.
- Kleinschmidt, M.A., Streubel, G., Samans, B., Krause, M., and Bauer, U.M. 2008. The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation. *Nucleic Acids Res* **36**(10): 3202-3213.
- Klenow, H. and Henningsen, I. 1970. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from Escherichia coli B by limited proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **65**(1): 168-175.
- Koh, S.S., Chen, D., Lee, Y.H., and Stallcup, M.R. 2001. Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem* **276**(2): 1089-1098.
- Koh, S.S., Li, H., Lee, Y.H., Widelitz, R.B., Chuong, C.M., and Stallcup, M.R. 2002. Synergistic coactivator function by coactivator-associated arginine methyltransferase (CARM) 1 and beta-catenin with two different classes of DNA-binding transcriptional activators. *J Biol Chem* **277**(29): 26031-26035.
- Komyod, W., Bauer, U.M., Heinrich, P.C., Haan, S., and Behrmann, I. 2005. Are STATS arginine-methylated? *The Journal of biological chemistry* **280**(23): 21700-21705.
- Kowenz-Leutz, E. and Leutz, A. 1999. A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Molecular cell* **4**(5): 735-743.
- Krause, C.D., Yang, Z.H., Kim, Y.S., Lee, J.H., Cook, J.R., and Pestka, S. 2007. Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacology & therapeutics* **113**(1): 50-87.
- Krystosek, A. and Sachs, L. 1976. Control of lysozyme induction in the differentiation of myeloid leukemic cells. *Cell* **9**(4 PT 2): 675-684.
- Kunert, N., Wagner, E., Murawska, M., Klinker, H., Kremmer, E., and Brehm, A. 2009. dMec: a novel Mi-2 chromatin remodelling complex involved in transcriptional repression. *The EMBO journal* **28**(5): 533-544.
- Kwak, Y.T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K.J., Surabhi, R.M., Miller, B., Gehrig, P., and Gaynor, R.B. 2003. Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Molecular cell* **11**(4): 1055-1066.
- Lacroix, M., Messaoudi, S.E., Rodier, G., Le Cam, A., Sardet, C., and Fabbrizio, E. 2008. The histone-binding protein COPR5 is required for nuclear functions of the protein arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO reports* **9**(5): 452-458.
- Leary, J.F., Ohlsson-Wilhelm, B.M., Giuliano, R., LaBella, S., Farley, B., and Rowley, P.T. 1987. Multipotent human hematopoietic cell line K562: lineage-specific constitutive and inducible antigens. *Leukemia research* **11**(9): 807-815.
- Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S., and Bedford, M.T. 2005. PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *The Journal of biological chemistry* **280**(38): 32890-32896.

- Lee, Y.H., Campbell, H.D., and Stallcup, M.R. 2004. Developmentally essential protein flightless I is a nuclear receptor coactivator with actin binding activity. *Mol Cell Biol* **24**(5): 2103-2117.
- Lee, Y.H., Koh, S.S., Zhang, X., Cheng, X., and Stallcup, M.R. 2002. Synergy among nuclear receptor coactivators: selective requirement for protein methyltransferase and acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol* **22**(11): 3621-3632.
- Levy, D.E. and Darnell, J.E., Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews* **3**(9): 651-662.
- Li, H., Ahonen, T.J., Alanen, K., Xie, J., LeBaron, M.J., Pretlow, T.G., Ealley, E.L., Zhang, Y., Nurmi, M., Singh, B., Martikainen, P.M., and Nevalainen, M.T. 2004. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *Cancer research* **64**(14): 4774-4782.
- Li, H., Park, S., Kilburn, B., Jelinek, M.A., Henschen-Edman, A., Aswad, D.W., Stallcup, M.R., and Laird-Offringa, I.A. 2002. Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **277**(47): 44623-44630.
- Li, X., Hu, X., Patel, B., Zhou, Z., Liang, S., Ybarra, R., Qiu, Y., Felsenfeld, G., Bungert, J., and Huang, S. H4R3 methylation facilitates {beta}-globin transcription by regulating histone acetyltransferase binding and H3 acetylation. *Blood*.
- Lidonnici, M.R., Corradini, F., Waldron, T., Bender, T.P., and Calabretta, B. 2008. Requirement of c-Myb for p210(BCR/ABL)-dependent transformation of hematopoietic progenitors and leukemogenesis. *Blood* **111**(9): 4771-4779.
- Liem, H.H., Cardenas, F., Tavassoli, M., Poh-Fitzpatrick, M.B., and Muller-Eberhard, U. 1979. Quantitative determination of hemoglobin and cytochemical staining for peroxidase using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, a safe substitute for benzidine. *Analytical biochemistry* **98**(2): 388-393.
- Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., and Herschman, H.R. 1996. The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **271**(25): 15034-15044.
- Lipsick, J.S. and Wang, D.M. 1999. Transformation by v-Myb. *Oncogene* **18**(19): 3047-3055.
- Lischke, A., Moriggl, R., Brandlein, S., Berchtold, S., Kammer, W., Sebald, W., Groner, B., Liu, X., Hennighausen, L., and Friedrich, K. 1998. The interleukin-4 receptor activates STAT5 by a mechanism that relies upon common gamma-chain. *The Journal of biological chemistry* **273**(47): 31222-31229.
- Litterst, C.M., Kliem, S., Marilley, D., and Pfitzner, E. 2003. NCoA-1/SRC-1 is an essential coactivator of STAT5 that binds to the FDL motif in the alpha-helical region of the STAT5 transactivation domain. *The Journal of biological chemistry* **278**(46): 45340-45351.
- Liu, F., Lei, W., O'Rourke, J.P., and Ness, S.A. 2006. Oncogenic mutations cause dramatic, qualitative changes in the transcriptional activity of c-Myb. *Oncogene* **25**(5): 795-805.
- Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., and Hennighausen, L. 1997. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes & development* **11**(2): 179-186.

- Lozzio, C.B. and Lozzio, B.B. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**(3): 321-334.
- Luisi-DeLuca, C., Mitchell, T., Spriggs, D., and Kufe, D.W. 1984. Induction of terminal differentiation in human K562 erythroleukemia cells by arabinofuranosylcytosine. *The Journal of clinical investigation* **74**(3): 821-827.
- Luscombe, N.M., Laskowski, R.A., and Thornton, J.M. 2001. Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic acids research* **29**(13): 2860-2874.
- Ma, H., Baumann, C.T., Li, H., Strahl, B.D., Rice, R., Jelinek, M.A., Aswad, D.W., Allis, C.D., Hager, G.L., and Stallcup, M.R. 2001. Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated Promotor. *Curr Biol* **11**(24): 1981-1985.
- Majumder, S., Liu, Y., Ford, O.H., 3rd, Mohler, J.L., and Whang, Y.E. 2006. Involvement of arginine methyltransferase CARM1 in androgen receptor function and prostate cancer cell viability. *Prostate* **66**(12): 1292-1301.
- Marfella, C.G. and Imbalzano, A.N. 2007. The Chd family of chromatin remodelers. *Mutation research* **618**(1-2): 30-40.
- Margueron, R., Trojer, P., and Reinberg, D. 2005. The key to development: interpreting the histone code? *Current opinion in genetics & development* **15**(2): 163-176.
- Matre, V., Hovring, P.I., Fjeldheim, A.K., Helgeland, L., Orvain, C., Andersson, K.B., Gautvik, K.M., and Gabrielsen, O.S. 2003. The human neuroendocrine thyrotropin-releasing hormone receptor Promotor is activated by the haematopoietic transcription factor c-Myb. *The Biochemical journal* **372**(Pt 3): 851-859.
- Mattei, S., Klein, G., Satre, M., and Aubry, L. 2006. Trafficking and developmental signaling: Alix at the crossroads. *European journal of cell biology* **85**(9-10): 925-936.
- Maurice, D., Hooper, J., Lang, G., and Weston, K. 2007. c-Myb regulates lineage choice in developing thymocytes via its target gene Gata3. *The EMBO journal* **26**(15): 3629-3640.
- Meissner, T., Krause, E., Lodige, I., and Vinkemeier, U. 2004. Arginine methylation of STAT1: a reassessment. *Cell* **119**(5): 587-589; discussion 589-590.
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. 2003. Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target Promotor. *Cell* **115**(6): 751-763.
- Minowada, J., Onuma, T., and Moore, G.E. 1972. Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *Journal of the National Cancer Institute* **49**(3): 891-895.
- Miranda, T.B., Miranda, M., Frankel, A., and Clarke, S. 2004. PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* **279**(22): 22902-22907.
- Mitchell, J.B., Thornton, J.M., Singh, J., and Price, S.L. 1992. Towards an understanding of the arginine-aspartate interaction. *Journal of molecular biology* **226**(1): 251-262.
- Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Laumonier, Y., Xu, H., and Leutz, A. 2005. Histone H3 tail positioning and acetylation by the c-Myb but not the v-Myb DNA-binding SANT domain. *Genes & development* **19**(20): 2447-2457.

- Moriggl, R., Topham, D.J., Teglund, S., Sexl, V., McKay, C., Wang, D., Hoffmeyer, A., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Bunting, K.D., Grosveld, G.C., and Ihle, J.N. 1999. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity* **10**(2): 249-259.
- Mowen, K.A., Schurter, B.T., Fathman, J.W., David, M., and Glimcher, L.H. 2004. Arginine methylation of NIP45 modulates cytokine gene expression in effector T lymphocytes. *Molecular cell* **15**(4): 559-571.
- Mowen, K.A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B.T., Shuai, K., Herschman, H.R., and David, M. 2001. Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell* **104**(5): 731-741.
- Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J., Jr., and Potter, S.S. 1991. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* **65**(4): 677-689.
- Murawska, M., Kunert, N., van Vugt, J., Langst, G., Kremmer, E., Logie, C., and Brehm, A. 2008. dCHD3, a novel ATP-dependent chromatin remodeler associated with sites of active transcription. *Molecular and cellular biology* **28**(8): 2745-2757.
- Musselman, C.A., Mansfield, R.E., Garske, A.L., Davrazou, F., Kwan, A.H., Oliver, S.S., O'Leary, H., Denu, J.M., Mackay, J.P., and Kutateladze, T.G. 2009. Binding of the CHD4 PHD2 finger to histone H3 is modulated by covalent modifications. *The Biochemical journal* **423**(2): 179-187.
- Naeem, H., Cheng, D., Zhao, Q., Underhill, C., Tini, M., Bedford, M.T., and Torchia, J. 2007. The activity and stability of the transcriptional coactivator p/CIP/SRC-3 are regulated by CARM1-dependent methylation. *Mol Cell Biol* **27**(1): 120-134.
- Najbauer, J., Johnson, B.A., Young, A.L., and Aswad, D.W. 1993. Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *The Journal of biological chemistry* **268**(14): 10501-10509.
- Nakagoshi, H., Kanei-Ishii, C., Sawazaki, T., Mizuguchi, G., and Ishii, S. 1992. Transcriptional activation of the c-myc gene by the c-myb and B-myb gene products. *Oncogene* **7**(6): 1233-1240.
- Nakata, Y., Shetzline, S., Sakashita, C., Kalota, A., Rallapalli, R., Rudnick, S.I., Zhang, Y., Emerson, S.G., and Gewirtz, A.M. 2007. c-Myb contributes to G2/M cell cycle transition in human hematopoietic cells by direct regulation of cyclin B1 expression. *Molecular and cellular biology* **27**(6): 2048-2058.
- Ness, S.A., Kowenz-Leutz, E., Casini, T., Graf, T., and Leutz, A. 1993. Myb and NF-M: combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. *Genes & development* **7**(5): 749-759.
- Ness, S.A., Marknell, A., and Graf, T. 1989. The v-myb oncogene product binds to and activates the promyelocyte-specific mim-1 gene. *Cell* **59**(6): 1115-1125.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**(6): 255-262.
- Odorizzi, G. 2006. The multiple personalities of Alix. *Journal of cell science* **119**(Pt 15): 3025-3032.

- Oelgeschlager, M., Janknecht, R., Krieg, J., Schreek, S., and Luscher, B. 1996. Interaction of the co-activator CBP with Myb proteins: effects on Myb-specific transactivation and on the cooperativity with NF-M. *The EMBO journal* **15**(11): 2771-2780.
- Oh, I.H. and Reddy, E.P. 1999. The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* **18**(19): 3017-3033.
- Ohkura, N., Takahashi, M., Yaguchi, H., Nagamura, Y., and Tsukada, T. 2005. Coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CARM1, affects pre-mRNA splicing in an isoform-specific manner. *J Biol Chem* **280**(32): 28927-28935.
- Pahlich, S., Zakaryan, R.P., and Gehring, H. 2006. Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. *Biochimica et biophysica acta* **1764**(12): 1890-1903.
- Paik, W.K. and Kim, S. 1968. Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. *The Journal of biological chemistry* **243**(9): 2108-2114.
- Paik, W.K.a.K., S. 1980. *Natural occurrence of various methylated amino acid derivatives*. John Wiley & Sons, New York.
- Pal, S., Baiocchi, R.A., Byrd, J.C., Grever, M.R., Jacob, S.T., and Sif, S. 2007. Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma. *The EMBO journal* **26**(15): 3558-3569.
- Pal, S. and Sif, S. 2007. Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases. *Journal of cellular physiology* **213**(2): 306-315.
- Pal, S., Vishwanath, S.N., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sif, S. 2004. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Molecular and cellular biology* **24**(21): 9630-9645.
- Pal, S., Yun, R., Datta, A., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Kumar, J., Tempst, P., and Sif, S. 2003. mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. *Molecular and cellular biology* **23**(21): 7475-7487.
- Park, S.H., Yamashita, H., Rui, H., and Waxman, D.J. 2001. Serine phosphorylation of GH-activated signal transducer and activator of transcription 5a (STAT5a) and STAT5b: impact on STAT5 transcriptional activity. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **15**(12): 2157-2171.
- Pastorcic, M. and Das, H.K. 2007. The C-terminal region of CHD3/ZFH interacts with the CIDD region of the Ets transcription factor ERM and represses transcription of the human presenilin 1 gene. *The FEBS journal* **274**(6): 1434-1448.
- Paukku, K. and Silvennoinen, O. 2004. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine & growth factor reviews* **15**(6): 435-455.
- Pawlak, M.R., Scherer, C.A., Chen, J., Roshon, M.J., and Ruley, H.E. 2000. Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Molecular and cellular biology* **20**(13): 4859-4869.
- Pfützner, E., Jahne, R., Wissler, M., Stoecklin, E., and Groner, B. 1998. p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the

- Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **12**(10): 1582-1593.
- Plachetka, A., Chayka, O., Wilczek, C., Melnik, S., Bonifer, C., and Klempnauer, K.H. 2008. C/EBPbeta induces chromatin opening at a cell-type-specific enhancer. *Molecular and cellular biology* **28**(6): 2102-2112.
- Pollack, B.P., Kotenko, S.V., He, W., Izotova, L.S., Barnoski, B.L., and Pestka, S. 1999. The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *The Journal of biological chemistry* **274**(44): 31531-31542.
- Raijmakers, R., Zendman, A.J., Egberts, W.V., Vossenaar, E.R., Raats, J., Soede-Huijbregts, C., Rutjes, F.P., van Veelen, P.A., Drijfhout, J.W., and Pruijn, G.J. 2007. Methylation of arginine residues interferes with citrullination by peptidylarginine deiminases in vitro. *Journal of molecular biology* **367**(4): 1118-1129.
- Ramsay, R.G. and Gonda, T.J. 2008. MYB function in normal and cancer cells. *Nature reviews* **8**(7): 523-534.
- Rawal, N., Rajpurohit, R., Paik, W.K., and Kim, S. 1994. Purification and characterization of S-adenosylmethionine-protein-arginine N-methyltransferase from rat liver. *The Biochemical journal* **300** (Pt 2): 483-489.
- Reinberg, D., Chuikov, S., Farnham, P., Karachentsev, D., Kirmizis, A., Kuzmichev, A., Margueron, R., Nishioka, K., Preissner, T.S., Sarma, K., Abate-Shen, C., Steward, R., and Vaquero, A. 2004. Steps toward understanding the inheritance of repressive methyl-lysine marks in histones. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **69**: 171-182.
- Rho, J., Choi, S., Seong, Y.R., Cho, W.K., Kim, S.H., and Im, D.S. 2001. Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family. *The Journal of biological chemistry* **276**(14): 11393-11401.
- Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Kolytcheff, C., Rostan, M.C., Corbo, L., and Le Romancer, M. 2007. hCAF1, a new regulator of PRMT1-dependent arginine methylation. *Journal of cell science* **120**(Pt 4): 638-647.
- Rolling, C., Treton, D., Pellegrini, S., Galanaud, P., and Richard, Y. 1996. IL4 and IL13 receptors share the gamma c chain and activate STAT6, STAT3 and STAT5 proteins in normal human B cells. *FEBS letters* **393**(1): 53-56.
- Rosson, D. and O'Brien, T.G. 1995. Constitutive c-myb expression in K562 cells inhibits induced erythroid differentiation but not tetradecanoyl phorbol acetate-induced megakaryocytic differentiation. *Molecular and cellular biology* **15**(2): 772-779.
- Rowley, P.T., Ohlsson-Wilhelm, B.M., Farley, B.A., and LaBella, S. 1981. Inducers of erythroid differentiation in K562 human leukemia cells. *Experimental hematology* **9**(1): 32-37.
- Ruthenburg, A.J., Li, H., Patel, D.J., and Allis, C.D. 2007. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nature reviews* **8**(12): 983-994.
- Ryme, J., Asp, P., Bohm, S., Cavellan, E., and Farrants, A.K. 2009. Variations in the composition of mammalian SWI/SNF chromatin remodelling complexes. *Journal of cellular biochemistry* **108**(3): 565-576.
- Saether, T., Berge, T., Ledsaak, M., Matre, V., Alm-Kristiansen, A.H., Dahle, O., Aubry, F., and Gabrielsen, O.S. 2007. The chromatin remodeling factor Mi-2alpha acts as a novel co-

- activator for human c-Myb. *The Journal of biological chemistry* **282**(19): 13994-14005.
- Sasaki, D., Kosunago, S., Mikami, T., Matsumoto, T., and Suzuki, M. 1994. Growth-inhibition by hemin in K562 human leukemic cells is related to hemoglobin-producing activity. *Biological & pharmaceutical bulletin* **17**(5): 586-590.
- Sayegh, J., Webb, K., Cheng, D., Bedford, M.T., and Clarke, S.G. 2007. Regulation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) activity by its N-terminal domain. *The Journal of biological chemistry* **282**(50): 36444-36453.
- Schmidt, M., Nazarov, V., Stevens, L., Watson, R., and Wolff, L. 2000. Regulation of the resident chromosomal copy of c-myc by c-Myb is involved in myeloid leukemogenesis. *Molecular and cellular biology* **20**(6): 1970-1981.
- Schneider, U. and Schwenk, H.U. 1977. Characterization of "T" and "non-T" cell lines established from children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma after leukemic transformation. *Haematology and blood transfusion* **20**: 265-269.
- Schultz, D.C., Friedman, J.R., and Rauscher, F.J., 3rd. 2001. Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes & development* **15**(4): 428-443.
- Scott, H.S., Antonarakis, S.E., Lalioti, M.D., Rossier, C., Silver, P.A., and Henry, M.F. 1998. Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2). *Genomics* **48**(3): 330-340.
- Seelig, H.P., Moosbrugger, I., Ehrfeld, H., Fink, T., Renz, M., and Genth, E. 1995. The major dermatomyositis-specific Mi-2 autoantigen is a presumed helicase involved in transcriptional activation. *Arthritis and rheumatism* **38**(10): 1389-1399.
- Seelig, H.P., Renz, M., Targoff, I.N., Ge, Q., and Frank, M.B. 1996. Two forms of the major antigenic protein of the dermatomyositis-specific Mi-2 autoantigen. *Arthritis and rheumatism* **39**(10): 1769-1771.
- Sexl, V., Piekorz, R., Moriggl, R., Rohrer, J., Brown, M.P., Bunting, K.D., Rothhammer, K., Roussel, M.F., and Ihle, J.N. 2000. Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. *Blood* **96**(6): 2277-2283.
- Shetzline, S.E., Rallapalli, R., Dowd, K.J., Zou, S., Nakata, Y., Swider, C.R., Kalota, A., Choi, J.K., and Gewirtz, A.M. 2004. Neuromedin U: a Myb-regulated autocrine growth factor for human myeloid leukemias. *Blood* **104**(6): 1833-1840.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G., Paul, W.E., and Ihle, J.N. 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* **380**(6575): 630-633.
- Shimono, K., Shimono, Y., Shimokata, K., Ishiguro, N., and Takahashi, M. 2005. Microspherule protein 1, Mi-2beta, and RET finger protein associate in the nucleolus and up-regulate ribosomal gene transcription. *The Journal of biological chemistry* **280**(47): 39436-39447.
- Shimono, Y., Murakami, H., Kawai, K., Wade, P.A., Shimokata, K., and Takahashi, M. 2003. Mi-2 beta associates with BRG1 and RET finger protein at the distinct regions with

- transcriptional activating and repressing abilities. *The Journal of biological chemistry* **278**(51): 51638-51645.
- Shin, D.H., Li, S.H., Chun, Y.S., Huang, L.E., Kim, M.S., and Park, J.W. 2008. CITED2 mediates the paradoxical responses of HIF-1 α to proteasome inhibition. *Oncogene* **27**(13): 1939-1944.
- Sif, S., Saurin, A.J., Imbalzano, A.N., and Kingston, R.E. 2001. Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes. *Genes & development* **15**(5): 603-618.
- Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A., and Arndt, K.M. 2003. Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *The EMBO journal* **22**(8): 1846-1856.
- Singh, V., Miranda, T.B., Jiang, W., Frankel, A., Roemer, M.E., Robb, V.A., Gutmann, D.H., Herschman, H.R., Clarke, S., and Newsham, I.F. 2004. DAL-1/4.1B tumor suppressor interacts with protein arginine N-methyltransferase 3 (PRMT3) and inhibits its ability to methylate substrates in vitro and in vivo. *Oncogene* **23**(47): 7761-7771.
- Slany, R.K. 2005. When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia. *Hematological oncology* **23**(1): 1-9.
- Socolovsky, M., Fallon, A.E., Wang, S., Brugnara, C., and Lodish, H.F. 1999. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* **98**(2): 181-191.
- Sparmann, A. and van Lohuizen, M. 2006. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**(11): 846-856.
- Sridharan, R. and Smale, S.T. 2007. Predominant interaction of both Ikaros and Helios with the NuRD complex in immature thymocytes. *The Journal of biological chemistry* **282**(41): 30227-30238.
- Srinivasan, R., Mager, G.M., Ward, R.M., Mayer, J., and Svaren, J. 2006. NAB2 represses transcription by interacting with the CHD4 subunit of the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. *The Journal of biological chemistry* **281**(22): 15129-15137.
- Stallcup, M.R., Chen, D., Koh, S.S., Ma, H., Lee, Y.H., Li, H., Schurter, B.T., and Aswad, D.W. 2000. Co-operation between protein-acetylating and protein-methylating co-activators in transcriptional activation. *Biochemical Society transactions* **28**(4): 415-418.
- Stielow, B., Sapetschnig, A., Kruger, I., Kunert, N., Brehm, A., Boutros, M., and Suske, G. 2008. Identification of SUMO-dependent chromatin-associated transcriptional repression components by a genome-wide RNAi screen. *Molecular cell* **29**(6): 742-754.
- Strahl, B.D., Briggs, S.D., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Koh, S.S., Ma, H., Cook, R.G., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Stallcup, M.R., and Allis, C.D. 2001. Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Curr Biol* **11**(12): 996-1000.
- Swiercz, R., Cheng, D., Kim, D., and Bedford, M.T. 2007. Ribosomal protein rpS2 is hypomethylated in PRMT3-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* **282**(23): 16917-16923.

- Swiercz, R., Person, M.D., and Bedford, M.T. 2005. Ribosomal protein S2 is a substrate for mammalian PRMT3 (protein arginine methyltransferase 3). *The Biochemical journal* **386**(Pt 1): 85-91.
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* **380**(6575): 627-630.
- Tan, S.H., Dagvadorj, A., Shen, F., Gu, L., Liao, Z., Abdulghani, J., Zhang, Y., Gelmann, E.P., Zellweger, T., Culig, Z., Visakorpi, T., Bubendorf, L., Kirken, R.A., Karras, J., and Nevalainen, M.T. 2008. Transcription factor Stat5 synergizes with androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer research* **68**(1): 236-248.
- Tang, J., Frankel, A., Cook, R.J., Kim, S., Paik, W.K., Williams, K.R., Clarke, S., and Herschman, H.R. 2000. PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **275**(11): 7723-7730.
- Tang, J., Gary, J.D., Clarke, S., and Herschman, H.R. 1998. PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *The Journal of biological chemistry* **273**(27): 16935-16945.
- Teyssier, C., Chen, D., and Stallcup, M.R. 2002. Requirement for multiple domains of the protein arginine methyltransferase CARM1 in its transcriptional coactivator function. *J Biol Chem* **277**(48): 46066-46072.
- Tong, J.K., Hassig, C.A., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., and Schreiber, S.L. 1998. Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature* **395**(6705): 917-921.
- Torres-Padilla, M.E., Parfitt, D.E., Kouzarides, T., and Zernicka-Goetz, M. 2007. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* **445**(7124): 214-218.
- Troffer-Charlier, N., Cura, V., Hassenboehler, P., Moras, D., and Cavarelli, J. 2007a. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic study of isolated modules of the mouse coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Acta crystallographica* **63**(Pt 4): 330-333.
- . 2007b. Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains. *EMBO J* **26**(20): 4391-4401.
- Underhill, C., Qutob, M.S., Yee, S.P., and Torchia, J. 2000. A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *The Journal of biological chemistry* **275**(51): 40463-40470.
- Wade, P.A., Jones, P.L., Vermaak, D., and Wolffe, A.P. 1998. A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from *Xenopus laevis* cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. *Curr Biol* **8**(14): 843-846.
- Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P., and Zhang, Y. 2001a. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Molecular cell* **8**(6): 1207-1217.
- Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P., and Zhang, Y. 2001b. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science (New York, NY)* **293**(5531): 853-857.

- Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.H., Perlin, J.R., Leonelli, L., Sonbuchner, L.S., McDonald, C.H., Cook, R.G., Dou, Y., Roeder, R.G., Clarke, S., Stallcup, M.R., Allis, C.D., and Coonrod, S.A. 2004. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyl elimination. *Science (New York, NY)* **306**(5694): 279-283.
- Weber, S., Maass, F., Schuemann, M., Krause, E., Suske, G., and Bauer, U.M. 2009. PRMT1-mediated arginine methylation of PIAS1 regulates STAT1 signaling. *Genes & development* **23**(1): 118-132.
- Wei, Y., Horng, J.C., Vendel, A.C., Raleigh, D.P., and Lumb, K.J. 2003. Contribution to stability and folding of a buried polar residue at the CARM1 methylation site of the KIX domain of CBP. *Biochemistry* **42**(23): 7044-7049.
- Weiss, V.H., McBride, A.E., Soriano, M.A., Filman, D.J., Silver, P.A., and Hogle, J.M. 2000. The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nature structural biology* **7**(12): 1165-1171.
- Westin, E.H., Gallo, R.C., Arya, S.K., Eva, A., Souza, L.M., Baluda, M.A., Aaronson, S.A., and Wong-Staal, F. 1982. Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**(7): 2194-2198.
- Williams, C.J., Naito, T., Arco, P.G., Seavitt, J.R., Cashman, S.M., De Souza, B., Qi, X., Keables, P., Von Andrian, U.H., and Georgopoulos, K. 2004. The chromatin remodeler Mi-2beta is required for CD4 expression and T cell development. *Immunity* **20**(6): 719-733.
- Wittig, I. and Groner, B. 2005. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), a crucial regulator of immune and cancer cells. *Current drug targets* **5**(4): 449-463.
- Wolf, S.S. 2009. The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell Mol Life Sci* **66**(13): 2109-2121.
- Wu, Q., Bruce, A.W., Jedrusik, A., Ellis, P.D., Andrews, R.M., Langford, C.F., Glover, D.M., and Zernicka-Goetz, M. 2009. CARM1 is required in embryonic stem cells to maintain pluripotency and resist differentiation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **27**(11): 2637-2645.
- Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B.M., Montminy, M., and Evans, R.M. 2001. A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science (New York, NY)* **294**(5551): 2507-2511.
- Xu, W., Cho, H., Kadam, S., Banayo, E.M., Anderson, S., Yates, J.R., 3rd, Emerson, B.M., and Evans, R.M. 2004. A methylation-mediator complex in hormone signaling. *Genes & development* **18**(2): 144-156.
- Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Cote, J., and Wang, W. 1998. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Molecular cell* **2**(6): 851-861.
- Yadav, N., Cheng, D., Richard, S., Morel, M., Iyer, V.R., Aldaz, C.M., and Bedford, M.T. 2008. CARM1 promotes adipocyte differentiation by coactivating PPARgamma. *EMBO reports* **9**(2): 193-198.
- Yadav, N., Lee, J., Kim, J., Shen, J., Hu, M.C., Aldaz, C.M., and Bedford, M.T. 2003. Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(11): 6464-6468.

- Yamkamon, V., Ivanova, O., Braas, D., Chayka, O., Patmasiriwat, P., and Klempnauer, K.H. 2008. A dual activation mechanism for Myb-responsive genes in myelomonocytic cells. *Blood cells, molecules & diseases* **40**(2): 219-226.
- Yoshida, T., Hazan, I., Zhang, J., Ng, S.Y., Naito, T., Snippert, H.J., Heller, E.J., Qi, X., Lawton, L.N., Williams, C.J., and Georgopoulos, K. 2008. The role of the chromatin remodeler Mi-2beta in hematopoietic stem cell self-renewal and multilineage differentiation. *Genes & development* **22**(9): 1174-1189.
- Yoshimoto, T., Boehm, M., Olive, M., Crook, M.F., San, H., Langenickel, T., and Nabel, E.G. 2006. The arginine methyltransferase PRMT2 binds RB and regulates E2F function. *Experimental cell research* **312**(11): 2040-2053.
- Young, P.J., Francis, J.W., Lince, D., Coon, K., Androphy, E.J., and Lorson, C.L. 2003. The Ewing's sarcoma protein interacts with the Tudor domain of the survival motor neuron protein. *Brain research* **119**(1): 37-49.
- Yu, Z., Chen, T., Hebert, J., Li, E., and Richard, S. 2009. A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation. *Molecular and cellular biology*.
- Yue, W.W., Hassler, M., Roe, S.M., Thompson-Vale, V., and Pearl, L.H. 2007. Insights into histone code syntax from structural and biochemical studies of CARM1 methyltransferase. *EMBO J* **26**(20): 4402-4412.
- Zhang, M.Y., Harhaj, E.W., Bell, L., Sun, S.C., and Miller, B.A. 1998a. Bcl-3 expression and nuclear translocation are induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin in proliferating human erythroid precursors. *Blood* **92**(4): 1225-1234.
- Zhang, X. and Cheng, X. 2003. Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure* **11**(5): 509-520.
- Zhang, X., Zhou, L., and Cheng, X. 2000. Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *The EMBO journal* **19**(14): 3509-3519.
- Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.P., Lane, W.S., and Reinberg, D. 1998b. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* **95**(2): 279-289.
- Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., and Reinberg, D. 1999. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & development* **13**(15): 1924-1935.
- Zhao, Q., Rank, G., Tan, Y.T., Li, H., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Cerruti, L., Curtis, D.J., Patel, D.J., Allis, C.D., Cunningham, J.M., and Jane, S.M. 2009. PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nature structural & molecular biology* **16**(3): 304-311.
- Zhao, X., Jankovic, V., Gural, A., Huang, G., Pardanan, A., Menendez, S., Zhang, J., Dunne, R., Xiao, A., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P., and Nimer, S.D. 2008. Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes & development* **22**(5): 640-653.
- Zika, E., Fauquier, L., Vandel, L., and Ting, J.P. 2005. Interplay among coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CBP, and CIITA in IFN-gamma-inducible MHC-II gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(45): 16321-16326.

9. Anhang

9.1. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Gundula Streubel
Geburtsdatum	24.05.1980
Geburtsort	Magdeburg
Nationalität	Deutsch

Wissenschaftlicher Werdegang

9/2005 - 2/2010	Dissertation am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg, Arbeitsgruppe von Prof. Uta-Maria Bauer Thema der Dissertation: „Die Identifikation und Charakterisierung neuer Interaktionspartner und Zielgene der Proteinargininmethyltransferase 4“
2/2005 - 8/2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Laboratorium für Molekulare Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg, Arbeitsgruppe von Prof. Erhard Bremer
2/2004 - 12/2004	Diplomarbeit im Laboratorium für Molekulare Mikrobiologie; Philipps-Universität Marburg, Arbeitsgruppe von Prof. Erhard Bremer Thema der Diplomarbeit: „Molekulargenetische und physiologische Analyse des kälteinduzierten <i>paiAB</i> -Operons von <i>Bacillus subtilis</i> “
10/1999 - 12/2004	Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Schwerpunktfach: Mikrobiologie
9/1998 - 8/1999	Praktikum am Institut für Neurobiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Arbeitsgruppe von Prof. Georg Reiser

Schulbildung

9/1992 - 07/1998	Gymnasium „Bettina v. Arnim“ Magdeburg Schulabschluss: Abitur
9/1986 - 07/1992	Allgemeinbildende polytechnische Oberschule „Marie Kühne“ Magdeburg

Die Ergebnisse dieser Arbeit gehen in folgende Publikationen ein:

Streubel, G., Bouchard, C., Zeller, M. , Teichmann, S., Bauer, U.M., Protein arginine methyltransferase PRMT4 and the chromatin remodeller Mi-2 are cooperative regulators of c-Myb. *in preperation*

Kleinschmidt*, M. A., Streubel*, G., Samans, B., Krause, M., Bauer, U. M. 2008, The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation. *Nucleic Acid Res.* 36:3202-3213. (* geteilte Erstautorenschaft)

9.2. Danksagung

Zuerst möchte ich Frau Prof. Uta-Maria Bauer für die Bereitstellung des spannenden Themas und die wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit, für ihr stets offenes Ohr und ihre Diskussionsbereitschaft danken.

Frau Prof. Renate Renkawitz-Pohl danke ich ausdrücklich für die Betreuung seitens des Fachbereichs Biologie und für die Begutachtung meiner Dissertation.

Dr. Jürgen Adamkiewicz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Müller möchte ich für die Durchführung und Auswertung der Massenspektrometrie danken.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Wolfgang Meißner, er war mir mit seinen vielen praktischen Tipps und Ratschlägen bei der Durchführung der Chromatographie eine sehr große Hilfe.

Ich möchte mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bauer für die angenehme und inspirierende Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche bedanken. Besonders Claudia Stein, Dawin Hyllus und Marc Zeller möchte ich einen großen Dank dafür aussprechen, dass ihr mich durch die Höhen und Tiefen meiner Doktorarbeit begleitet und mir mit eurem Humor den Laboralltag versüßt habt.

Bei Florian Maaß möchte ich an dieser Stelle endlich einmal Danke sagen, für die schönen gemeinsamen letzten Jahre, für deine Geduld in den letzten Monaten, das leckere Essen und vieles mehr.

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung und Aufmerksamkeit während meiner gesamten akademischen Ausbildung danken. Besonders meiner Mutter danke ich für die vielen aufmunternden Telefongespräche und „Care“-Pakete.

9.3. Erklärung

Erklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Die Identifikation und Charakterisierung neuer Interaktionspartner und Zielgene der Proteinargininmethyltransferase 4“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den
